







**Humane Papillomvirus-DNA-Lasten  
in (prä)malignen Genitaltumoren  
immunkompetenter und immunsupprimierter  
Patientinnen,  
in Hauttumoren und Psoriasisläsionen**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
**Sönke Jan Weißenborn**  
aus Bad Segeberg

Köln, 2002

Berichterstatter :

Prof. Dr. H. Pfister

Prof. Dr. D. Tautz

Tag der mündlichen Prüfung:

9. Januar 2003

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. Humane Papillomviren .....	1
1.2. Epidemiologie von Papillomvirus-Infektionen und resultierende .....	3
Krankheitsbilder .....	3
1.2.1. Zervixkarzinom und Vorstufen.....	6
1.2.2. Nicht-melanozytärer Hautkrebs (NMHK) .....	6
1.2.3. Psoriasis.....	8
1.3. Diagnostik von Papillomvirus-Infektionen .....	9
1.3.1. Morphologische Diagnose von HPV-Infektionen .....	11
1.3.2. Nachweis von genomischer HPV-DNA.....	13
1.3.2.1. Qualitative PCR.....	14
1.3.2.2. Quantitative PCR.....	14
<b>II. MATERIAL .....</b>	<b>18</b>
2.1. Patientenmaterial.....	18
2.1.1. Proben von Basaliomen, Plattenepithelkarzinomen der Haut und autologer gesunder Haut.....	18
2.1.2. Haut, Haarproben und Schuppen von Psoriatikern .....	18
2.1.3. Zervixabstriche und Biopsate .....	19
2.2. Chemikalien .....	20
2.3. Enzyme und Proteine .....	21
2.3.1. DNA-Polymerasen.....	21
2.3.2. Restriktionsendonukleasen.....	21
2.3.3. Modifizierende Enzyme.....	22
2.4. Nukleinsäuren.....	22
2.4.1. Vektoren.....	22
2.4.2. HPV-Referenz-Plasmide.....	22
2.5. Oligonukleotide .....	23
2.5.1. PCR-Primer.....	23
2.5.1.1. Primer für die reverse Transkription .....	23
2.5.1.2. Sequenzierprimer .....	24
2.5.2. DNA-Längenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.6. Gebrauchsfertige Reagenziensysteme.....	25

<b>2.7. Bakterienkultur .....</b>	<b>26</b>
2.7.1. Bakterienstämme .....	26
2.7.2. Medien und Zusätze für Bakterienkulturen .....	26
<b>2.8. Puffer und Lösungen.....</b>	<b>27</b>
2.8.1. Puffer für die Agarose Gelelektrophorese .....	27
<b>2.9. Software .....</b>	<b>27</b>
<b>2.10. Laborgeräte.....</b>	<b>27</b>
<b>III. METHODEN .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Isolation von DNA aus Patientenmaterialien.....</b>	<b>29</b>
3.1.1. Deparaffinisierung des Patientenmaterials .....	29
3.1.2. DNA-Extraktion aus Genitalabstrichen .....	29
3.1.3. DNA-Extraktion aus Biopsien.....	29
3.1.4. DNA-Extraktion aus mikrodissseziertem Material .....	30
<b>3.2. Isolation von RNA aus Patientenmaterialien.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3. Aufreinigung von PCR-Produkten .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4. Isolierung von Plasmid-DNA.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5. Photometrische DNA-Konzentrationsmessung .....</b>	<b>31</b>
<b>3.6. Herstellung von HPV-Plasmid-Verdünnungsreihen.....</b>	<b>31</b>
<b>3.7. DNA-Sequenzierung .....</b>	<b>32</b>
<b>3.8. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>32</b>
3.8.1. PCR-Protokolle qualitativer PCRs.....	32
3.8.1.1. Protokolle der neu etablierten nested-PCR-Protokolle zum Nachweis von mRNA des Onkogens E6 von HPV9, 24 und 38 .....	33
3.8.2. Allgemeines Protokoll für quantitative PCRs .....	33
<b>3.9. Reverse Transkription.....</b>	<b>35</b>
3.9.1 Reverse Transkription mit Oligo-dT <sub>23</sub> -Primern.....	35
3.9.2 Reverse Transkription mit Zufallsnonamer-Primern.....	35
<b>3.10. Herstellung von Kryostatschnitten.....</b>	<b>35</b>
<b>3.11. Sondenmarkierung für die in-situ Hybridisierung.....</b>	<b>36</b>
<b>3.12. Etablierung eines Protokolls für die in-situ Hybridisierung nach der TSA-Methode.....</b>	<b>36</b>

3.12.1. Protokoll der in-situ-Hybridisierung nach der TSA-Methode.....	37
<b>3.13. Mikrodissektion .....</b>	<b>38</b>
<b>3.14. Statistische Analyse.....</b>	<b>39</b>
<b>IV. ERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Etablierung von Echt-Zeit-PCR-Protokollen zur Bestimmung von Virusspiegeln genitaler und kutaner HPV .....</b>	<b>41</b>
4.1.1. Festlegung des zu amplifizierenden HPV-Genomabschnitts.....	41
4.1.2. Auswahl geeigneter Primersequenzen für die einfach- und nested PCR .....	42
4.1.2.1. Primer für den PCR-Nachweis HPV-spezifischer Sequenzen.....	42
4.1.3. Auswahl geeigneter Sondensequenzen für die Echt-Zeit-PCR.....	44
4.1.3.1 Oligonukleotidsonden für die Quantifizierung im LightCycler .....	45
4.1.4. PCR-Reaktionsbedingungen .....	46
4.1.5. Neu etablierte Echt-Zeit-PCR-Protokolle zur Bestimmung von Virusspiegeln genitaler und kutaner HPVs.....	48
4.1.6. Erreichte Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit der neu etablierten Echt-Zeit-PCR Protokolle.....	48
<b>4.2. Etablierung von nested-PCR-Protokollen zum Nachweis von mRNA des Onkogens E6 von HPV9, 24 und 38 .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3. Untersuchung von Patientenproben.....</b>	<b>54</b>
4.3.1. Untersuchung nicht-melanozytärer Hauttumoren .....	54
4.3.1.1. In-situ-Hybridisierung von HPV-DNA in nicht-melanozytären Hauttumoren.....	54
4.3.1.2. Untersuchung von Probenpaaren gesunder Haut und Basaliomen, bzw. Plattenepithelkarzinomen auf E6-Onkogen-mRNA .....	55
4.3.1.2.1. Aufarbeitung der Patientengewebe und Überprüfung der Qualität der RNA-Isolation .....	55
4.3.1.2.2. Analyse der revers transkribierten RNA-Extrakte mittels HPV9- und HPV38 spezifischer PCR .....	57
4.3.1.3. Viruslast des HPV-Typs 8 in gesunder Haut und Tumoren der Haut .....	57
4.3.2. Viruslast der HPV-Typen 5, 20 und 36 in gesunder Haut und Schuppen von Psoriatikern ...	59
4.3.3. HPV-Lasten in Zervikalabstrichen.....	61
4.3.3.1. HPV16-DNA Lasten in Zervixabstrichen HIV-negativer und HIV-positiver Frauen.....	61
4.3.3.2. DNA-Lasten der HPV-Typen 18, 31, 33, 45 und 56 in Zervixabstrichen HIV-negativer und HIV-positiver Frauen .....	65
4.3.3.3. Mediane HPV-DNA-Lasten HIV-positiver Frauen differenziert nach CD4-Zellzahl, AIDS-Status und HIV-RNA-Last .....	66

4.3.3.4. Verlauf der HPV-DNA-Last bei individuellen HIV-positiven Patientinnen.....	68
4.4. HPV16-DNA-Lasten in mikrodisssezierten Tumorzellen von Zervixkarzinomen .....	68
V. DISKUSSION.....	70
VI. ZUSAMMENFASSUNG .....	81
VII. LITERATUR.....	85
VIII. ABKÜRZUNGEN .....	93

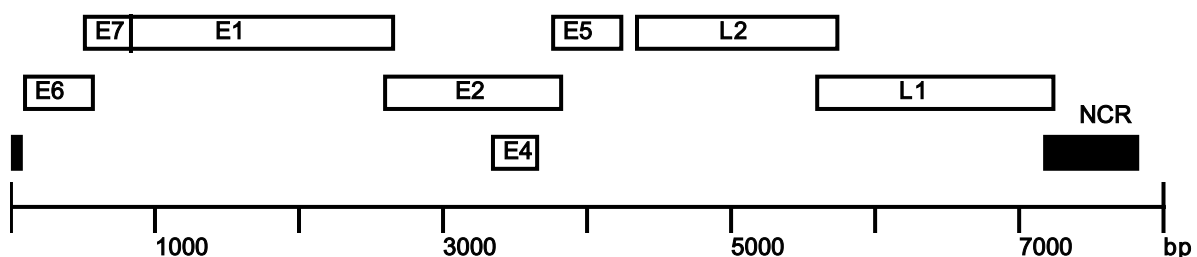
# I. EINLEITUNG

## 1.1. Humane Papillomviren

Humane Papillomviren (HPV) gehören zu der großen Familie der Papillomviren, die auch zahlreiche animale Papillomviren umfasst. Sie bilden eine Gruppe von kleinen (52-55 nm), unbehüllten Viren mit ringförmiger Doppelstrang-DNA, bestehend aus etwa 8000 Basenpaaren (bp) (Howley et al., 2001). Auf Grund von Sequenz-homologien lassen sich heute über 100 humane HPV-Typen unterscheiden. Nach phylogenetischen Analysen wurden die Papillomviren auf der Grundlage ihrer DNA-Sequenz von Chan *et al.* (1995) in die 5 übergeordneten Gruppen A-E mit jeweils mehreren Untergruppen eingeteilt (siehe Abbildung 2). Die Papillomviren des Menschen gehören zu den Gruppen A, B und E. Die Gruppe A enthält genital-/schleimhautassoziierte Typen. Die Gruppe B enthält in der Untergruppe B1 die Epidermodysplasia verruciformis (EV)-assoziierten HPV-Typen und eine wachsende Anzahl verwandter Sequenzen. In dieser Gruppe B1 wurden nach Myers *et al.*, (1997) weitere Untergruppen unterschieden. In Gruppe B2 finden sich die mit pigmentierten Warzen assoziierten Papillomviren, in Gruppe E die klassischen kutanen HPVs.

Papillomviren infizieren zunächst undifferenzierte Keratinozyten des Epithels der Haut oder Schleimhaut, die sie durch Mikroverletzungen der äußeren Schichten erreichen. Sie zeigen generell einen ausgeprägten Tropismus und daher wurden historisch kutane und mukosaassoziierte Typen unterschieden. Nach dem Grad ihrer Assoziation mit malignen Läsionen unterscheidet man außerdem Hoch- (engl. high-risk, hr-HPV) und Niedrig-Risiko HPVs (engl. low-risk, lr-HPV). Die Expression der Papillomvirus-Gene wird durch ein komplexes Zusammenspiel von viralen und zellulären Transkriptionsfaktoren kontrolliert, die mit Sequenzen in der nicht-kodierenden Region (NCR) interagieren (Fuchs et al., 1994). Der Verlauf der produktiven HPV-Infektion ist eng an den Differenzierungsstatus des Epithels gekoppelt. Die Genomorganisation von Papillomviren sowie die Funktionen der HPV-Genprodukte sind in Abbildung 1 und Tabelle 1 zusammengefasst. Von besonderer Bedeutung sind die viralen Proteine E6 und E7 der genitalen hr-HPVs, insbesondere der HPV-Typen 16 und 18. Für sie wurde in-vitro zelltransformierende Aktivität gezeigt. Neben zahlreichen anderen Proteinen interagieren sie mit den zellulären Tumorsuppressorproteinen p53 und dem Retinoblastoma Protein (pRb). p53 spielt

eine entscheidende Rolle bei der Apoptose und Zellzykluskontrolle, im Rahmen der zellulären Antwort auf DNA Schädigung und virale Infektionen. HPV16 und HPV18 E6 sind in der Lage p53 Degradation zu induzieren oder p53 durch Komplexbildung zu inaktivieren. Diese Störung des Schutzmechanismus führt zu erhöhter genetischer Instabilität der Zelle (Smola-Hess et al., 2002). pRb kann in seiner hypophosphorylierten Form den Zellzyklus arretieren. E7 von HPV16 und 18 kann pRb durch Bindung inaktivieren. Dadurch werden das Fortschreiten des Zellzyklus in die S-Phase und die Synthese viraler DNA ermöglicht (Galloway et al., 1996). Kürzlich konnte für E7 von HPV16 außerdem gezeigt werden, daß es die Zentrosomduplikation stört und damit zu verminderter genetischer Stabilität und der Entstehung von Aneuploidie beitragen kann (Duensing et al., 2002). Für einige kutane HPVs wurde gezeigt, daß das papillomavirale E6-Protein in der Lage ist das zelluläre Protein Bak zu binden und damit dessen proteolytischen Abbau einzuleiten. Bak spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptose als Antwort auf Schädigung durch UVB-Strahlung. Dadurch ist möglicherweise bei HPV-infizierten Zellen die Apoptose, als Antwort auf Schädigung durch UVB-Strahlung, gestört. Somit könnte es in diesen Zellen zu einer Akkumulation von Mutationen kommen, die zu der Entwicklung von nicht melanozytären Hauttumoren (NMHK) führen (Jackson et al., 2000a; Jackson et al., 2000b).



**Abbildung 1:** Genom-Organisation von HPV16.

7,906 bp; NCR= Nichtkodierende Region



---

Gen-Produkt    Funktion

---

L1	Hauptkapsid-Protein, 55 kD, macht 80% der gesamten Kapsid-proteine aus
L2	Nebenkapsid-Protein, 70 kD
E1	Virale DNA-Replikation
E2	Virale DNA-Replikation und Regulation der Transkription
E4	Virusfreisetzung
E5	Onkoprotein, Mitose-stimulierend
E6	Onkoprotein, unter anderem Inaktivierung des Tumor-Suppressor-Proteins p53
E7	Onkoprotein, unter anderem Inaktivierung des Tumor-Suppressor-Proteins pRB

---

**Tabelle 1:** HPV Gen-Produkte.

## 1.2. Epidemiologie von Papillomvirus-Infektionen und resultierende

### Krankheitsbilder

HPV-Infektionen sind weltweit verbreitet. Die Erregerübertragung erfolgt durch direkten Kontakt zu Virusinfizierten, z.B. Warzenträgern, oder indirekt, z.B. durch Inokulation virustragender Hornschuppen vom Boden. Im Fall genitaler HPVs gilt Geschlechtsverkehr als Hauptübertragungsweg. Nach einer Inkubationszeit von wenigen Wochen bis zu mehreren Monaten/Jahren können Infektionen zu lokal begrenzten Tumoren führen. Sie bilden sich meist spontan wieder zurück. Manche dieser Tumoren entarten jedoch nach längerer Persistenz, wobei das virale Genom in den Karzinomen persistiert und fortgesetzt partiell exprimiert wird (M.Howley et al., 2001). Zahlreiche Studien lieferten deutliche Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen und der malignen Entartung bestimmter Tumoren des Anogenitaltraktes, des Larynx und der Haut (Pfister, 1996; Pfister et al., 1997; zur Hausen, 1977). Die höchste Entartungsrate wurde bei Patienten mit Epidermodysplasia verruciformis (EV) beobachtet (Orth, 1987). In Tabelle 2 wurden die durch HPV-induzierten, benignen und malignen Erkrankungen zusammenfasst.

Der klinische Verlauf einer HPV-Infektion wird vom Immunsystem beeinflusst. Besonders die zelluläre Immunantwort scheint nach der Infektion eine wichtige Rolle zu spielen (Howley et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Patientenproben einer Vielzahl von HPV assoziierten Krankheiten untersucht werden. Als Gruppe mit etablierter HPV-Ätiologie wurden dabei zervikale Abstriche von HIV-positiven und HIV-negativen Frauen untersucht. Da das bekannte onkogene Potential einiger kutaner HPVs in Zusammenhang mit epidemiologischen Daten eine Rolle von HPV bei der Entstehung in NMHT vermuten lässt und für Psoriasis spekuliert wurde, daß papillomavirale Proteine eine Rolle in der Immunpathogenese spielen könnten, wurden Proben dieser Krankheiten für die Untersuchungen gewählt. Sie werden im Anschluss ausführlich beschrieben.

Tumor	HPV-Typ	
	häufig vorkommend	weniger häufig vorkommend
Benigne Hautwarzen		
Plantarwarzen	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup> , 4 <sup>a</sup> , 63 <sup>a</sup>
Vulgär- od. Mosaikwarzen	2 <sup>b</sup> , 27 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 7 <sup>b</sup> , 26 <sup>c</sup> , 28 <sup>b</sup> , 29 <sup>b</sup> , 57 <sup>b</sup> , 60 <sup>a</sup> , 65 <sup>a</sup>
Flache Warzen	3 <sup>b</sup> , 10 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup> , 26 <sup>c</sup> , 27 <sup>b</sup> , 28 <sup>b</sup> , 29 <sup>b</sup> , 41 <sup>a</sup> , 49 <sup>d</sup>
EV-spezif. Läsionen	5 <sup>d</sup> , 8 <sup>d</sup> , 17 <sup>d</sup> , 20 <sup>d</sup>	9 <sup>d</sup> , 12 <sup>d</sup> , 14 <sup>d</sup> , 15 <sup>d</sup> , 19-25 <sup>d</sup> , 36 <sup>d</sup> , 38 <sup>d</sup> , 46 <sup>d,e</sup> , 47 <sup>d</sup> , 50 <sup>d</sup>
Flache Warzen (EV-Pat.)	3 <sup>b</sup> , 10 <sup>b</sup>	
Hautwarzen von NTPL	1-6, 8, 10, 12, 15-17, 25, 27-29, 41, 49, 57, 75-77, ∞	
Anogenitale Läsion		
Condylomata acuminata	6 <sup>c</sup> , 11 <sup>c</sup>	2 <sup>b</sup> , 16 <sup>c</sup> , 30 <sup>c</sup> , 40 <sup>b</sup> , 41 <sup>a</sup> , 42 <sup>c</sup> , 44 <sup>c</sup> , 45 <sup>c</sup> , 54 <sup>c</sup> , 55 <sup>c</sup> , 61 <sup>b</sup>
CIN, VAIN, VIN, PAIN, PIN	6 <sup>c</sup> , 11 <sup>c</sup> , 16 <sup>c</sup> , 18 <sup>c</sup> , 31 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup> , 33-35 <sup>c</sup> , 39 <sup>c</sup> , 40 <sup>b</sup> , 42-45 <sup>c</sup> , 51-59 <sup>c</sup> 61 <sup>b</sup> , 62 <sup>b</sup> , 64 <sup>c</sup> , 66 <sup>c</sup> , 67-69 <sup>c</sup> , 71-74, 82, 83, ∞
Benigne Kopf- u. Halstumoren		
Orale Papillome (u. Leukopl.)	2 <sup>b</sup> , 6 <sup>c</sup> , 11 <sup>c</sup> , 16	7 <sup>b</sup> , 13, 32, 57, 72, 73
FEH Heck	13 <sup>c</sup> , 32 <sup>c</sup>	
Kehlkopf-Papillome (RRP)	6 <sup>c</sup> , 11 <sup>c</sup>	
Bindehaut-Papillome	6 <sup>c</sup> , 11 <sup>c</sup>	
Nasen-Papillome	6 <sup>c</sup> , 11 <sup>c</sup> , 57 <sup>b</sup>	

Fortsetzung nächste Seite

Tumor	HPV-Typ	
	häufig vorkommend	weniger häufig vorkommend
<b>Maligne Tumoren</b>		
Plattenepithel-Ca bei EV	5 <sup>d</sup> , 8 <sup>d</sup>	14 <sup>d</sup> , 17 <sup>d</sup> , 20 <sup>d</sup> , 47 <sup>d</sup>
Zervixkarzinome	16 <sup>c</sup> , 18 <sup>c</sup> , 31 <sup>c</sup> , 45 <sup>c</sup>	6 <sup>c</sup> , 10 <sup>b</sup> , 11 <sup>c</sup> , 26 <sup>c</sup> , 33 <sup>c</sup> , 35 <sup>c</sup> , 39 <sup>c</sup> , 51 <sup>c</sup> , 52 <sup>c</sup> , 55 <sup>c</sup> , 56 <sup>c</sup> , 58 <sup>c</sup> , 59 <sup>c</sup> , 66 <sup>c</sup> , 68 <sup>c</sup> , 73, ∞
Anogenitale-Ca	6 <sup>c</sup> , 16 <sup>c</sup> , 18 <sup>c</sup>	11 <sup>c</sup> , 31 <sup>c</sup> , 33 <sup>c</sup>
Larynx-Ca		6 <sup>c</sup> , 11 <sup>c</sup> , 16 <sup>c</sup> , 18 <sup>c</sup> , 30, 35 <sup>c</sup>
Ösophagus-Ca		6 <sup>c</sup> , 11 <sup>c</sup> , 16 <sup>c</sup> , 18 <sup>c</sup> , ∞
Bindehaut-, Augenlid-CA		6 <sup>c</sup> , 11 <sup>c</sup> , 16 <sup>c</sup> , 18 <sup>c</sup>
Maligne Hauttumoren* von	1-2, 4-9, 11, 14-16, 18-21, 23-25, 29, 32, 36, 38, 41-42, 48,	
NTPL	1, 54, 56, 60, 61, 69, ∞	
M. Bowen	1-2, 5, 6, 11, 15-16, 20, 25, 34, 35, 38, ∞	
Buschke-Löwenstein-Tumor	6, 11	
Orale Karzinome		2, 3, 6, 11, 16, 18, 57

**Tabelle 2:** HPV-Typen in benignen und malignen Tumoren (Wieland U. et al., 1997) (Walboomers et al., 1999a) (de Villiers et al., 1997).

VAIN = Vaginale intraepitheliale Neoplasie, VIN = Vulväre intraepitheliale Neoplasie, PIN = Penile intraepitheliale Neoplasie, PAIN = Perianale intraepitheliale Neoplasie, FEH = Fokale epitheliale Hyperplasie (M.Heck), RRP = Rezidivierende respiratorische Papillomatose, EV = Epidermodysplasia verruciformis, NTPL = Nierentransplantierte, CIN = Zervikale intraepitheliale Neoplasie, \*Plattenepithelkarzinome (Spinaliome) und Basaliome, ∞ = unklassifizierte HPV-Typen.

Die HPV-Gruppierung erfolgte nach DNA-Sequenz-Homologie sowie dem Zusammenhang mit den klinischen Läsionen.

<sup>a</sup> Kutan

<sup>b</sup> Kutan und Mukosa

<sup>c</sup> Mukosa

<sup>d</sup> Kutane EV

<sup>e</sup> HPV 46 ist ein Subtyp von HPV 20

### 1.2.1. Zervixkarzinom und Vorstufen

Zervixkarzinome sind mit weltweit mehr als 470000 Neuerkrankungen im Jahre 2000, die dritthäufigste maligne Erkrankung bei Frauen und ca. ein Drittel der erkrankten Frauen in den USA stirbt an deren Folgen (Ferlay et al., 2001). Die meisten Karzinome entstehen im Bereich der Transformationszone der Zervix. Die Vorläuferläsionen (squamous intraepithelial lesions, SIL) durchlaufen während der Progression eine Reihe von neoplastischen Veränderungen. Der Schweregrad einer Läsion und das assoziierte Potential zur malignen Entartung steigt mit dem Ausmaß, zu welchem undifferenzierte Zellen das Epithel ersetzen. Eine Gruppe von mukotropen HPV-Typen (Gruppe A), insbesondere HPV16, 18, 31, 33, 45 und 56, gelten als Hauptursache für die Entstehung von Zervixkarzinomen (zur Hausen, 2000). DNA von HPVs konnte in fast 100% aller Zervixkarzinome nachgewiesen werden (Bosch et al., 1995) (Walboomers et al., 1999b). Die Zusammenhänge zwischen HPV und der Entstehung von Zervixkarzinomen wurden in einer Vielzahl von Zellkultur- und molekularbiologischen Studien untersucht, wodurch das onkogene Potential der genitalen hr-HPV gezeigt werden konnte (Howley et al., 2001). Persistierende HPV-Infektionen sind mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Zervixkarzinomen assoziiert (Ahdieh et al., 2001).

Es wurde berichtet, daß erhöhte HPV-DNA-Lasten auf hochgradige Läsionen hinweisen könnten (Bavin et al., 1993; Cuzick et al., 1992; Flannelly et al., 1995). Frauen, die seropositiv für das humane Immundefizienz-Virus (HIV) sind, haben häufiger zervikale HPV-Infektionen, die Infektionen haben ein größeres Risiko für längere Persistenz und resultieren öfter in SIL. Dies gilt in besonderem Maße für Patientinnen mit weniger als 200 CD4-Zellen/µl Blut oder hohen HIV-RNA Lasten (Palefsky et al., 2001; Wright et al., 1994; Cardillo et al., 2001; Luque et al., 1999). Frauen mit HIV Infektionen haben ein 5- bis 12,8-mal höheres Risiko für die Entwicklung von Zervixkarzinomen als HIV negative Frauen (Frisch et al., 2000; Serraino et al., 1999b). Die „Centers for Disease Control and Prevention“ (CDC) zählen seit 1993 Zervixkarzinome zu den AIDS definierenden Krankheiten.

### 1.2.2. Nicht-melanozytärer Hautkrebs (NMHK)

Nicht-melanozytäre Tumoren der Haut (NMHK) stellen die häufigste Krebsart unter Kaukasiern dar. In den letzten Jahren ist die Inzidenz signifikant angestiegen.

Histologisch werden NMHK in Basaliome (engl. basal cell carcinomas , BCC) und Plattenepithelkarzinome (PEC) unterteilt. NMHK tritt in der Regel an sonnenexponierten Hautpartien auf. Als Hauptrisikofaktoren für NMHK gelten UV-Strahlung, Hautpigmentierung und Immunstatus. Basaliome treten viermal häufiger als Plattenepithelkarzinome auf. Immunsupprimierte Organtransplantatempfänger weisen ein bis zu 100-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen und ein 10-fach höheres für Basaliome auf. Dies führt zu einer Umkehrung des Verhältnisses Basaliome:Plattenepithelkarzinome (Kiviat, 1999; Leigh et al., 1999).

Die Beteiligung von HPV bei der Entstehung von NMHK wurde erstmals für die seltene, erbliche Krankheit Epidermodysplasia verruciformis (EV) gezeigt, die mit einem hohen Risiko für die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen verbunden ist. EV ist durch disseminierte, flache, warzenähnliche Effloreszenzen (HPV3, HPV10) und rötliche oder hypopigmentierte Maculae gekennzeichnet. Die in den makulösen Warzen dieser Patienten gefundenen HPV-Typen werden als EV-HPVs bezeichnet und klustern phylogenetisch in Gruppe B1. In benignen Läsionen dieser Patienten wurden diverse EV-HPV Typen identifiziert. In PEC hingegen, wurde hauptsächlich DNA von HPV5 und 8 und in seltenen Fällen HPV 14, 17, 20 und 47 gefunden (Howley et al., 2001). Unter Verwendung hochsensitiver „nested-PCR“ Protokolle, konnte die weite Verbreitung von EV-HPV-Typen auch in gesunder Haut und in Haarproben von Patienten mit und ohne NMHK gezeigt werden (Howley et al., 2001). Eine Analyse mehrerer Proben pro Patient zeigte eine Prävalenz von HPV-DNA von 50% bei immunkompetenten und fast 100% bei immunsupprimierten Patienten (Boxman et al., 1997). Ein Studie von Hautabstrichen von fünf verschiedenen Körperstellen zeigte, daß 80% von gesunden Kontrollen HPV positiv sind und legt nahe, daß jeder im Verlauf seines Lebens mit diversen HPV-Typen infiziert wird (Antonsson et al., 2000). Die Prävalenz von HPV-DNA ist im Allgemeinen höher bei immunsupprimierten Patienten, wobei die höchsten Prävalenzen in PECs immunsupprimierter Patienten (90%) gefunden wurden (Leigh et al., 1999; Berkhout et al., 2000; Harwood et al., 2000; Wieland et al., 2000b; Meyer et al., 2000). Unterschiede in der HPV-Prävalenz ließen sich durch die Analyse nur einer Probe normaler Haut von Kontrollen, im Vergleich zu normaler Haut von PEC Patienten und Hautkrebsbiopsien zeigen. Die HPV Prävalenzen waren 15, 22 und 86% in den jeweiligen Proben (O'Connor et al., 2001). Signifikante Unterschiede der HPV-

Prävalenz bei Nierentransplantatempfängern und immunkompetenten Patienten in normaler Haut (16% zu 8%) und PEC (43% zu 22%) konnten durch Verwendung des weniger sensitiven Southern Blots gezeigt werden (Stark et al., 1994). Diese Prävalenzen spiegeln mutmaßlich unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten, HPV nachzuweisen wider und lassen Schlüsse auf eine Assoziation von HPV mit PEC zu. Die Unterschiede zwischen immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten, deuten auf unterschiedliche Virusmengen in den Proben. Allgemein läßt die Notwendigkeit sensitivster Methoden zum Nachweis von HPV-DNA in Proben der Haut und in NMHK, auf sehr geringe Viruslasten schließen.

### 1.2.3. Psoriasis

Die Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine multifforme Hauterkrankung, die besonders häufig bei hellhäutigen Menschen auftritt. Mit einer Prävalenz von 2-3% zählt sie zu den häufigsten Hauterkrankungen. Von den verschiedenen klinischen Verlaufsformen überwiegt jene mit chronisch schuppenden, parakeratotischen Papeln und Plaques in charakteristischer Verteilung, meist an Stellen von wiederholten, geringfügigen Traumen (Psoriasis vulgaris). Die psoriatischen Läsionen beruhen auf erhöhter Proliferation und „Turnover“-Rate der Keratinozyten (Karasek, 1999).

Wie bei Christophers (1996) beschrieben, beruht die vorherrschende Theorie verschiedener Studien zur Pathogenese der Psoriasis auf der Beobachtung, daß T-Zellen in der frühen Krankheitsentwicklung aktiviert werden. Im zweiten Schritt wird das Wirtsgewebe, besonders die Epidermis, aktiviert, was mit erhöhter Zytokinproduktion, Hyperplasie der Epidermis, gestörter Differenzierung, Neutrophilie der subkornealen Zone und einer erhöhten Mastzellenzahl einhergeht. Es ist jedoch unbekannt welches Antigen die läsionalen T-Zellen aktiviert. Oftmals tritt der erste Ausbruch der Krankheit kurz nach einer Tonsillitis, ausgelöst durch  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe A, auf. Das deutet darauf hin, daß bakterielle Antigene, Proteine oder Toxine als Superantigene wirken könnten. Bei 45% der Patienten sind geringfügige Traumen auslösende Faktoren (Koebener-Phänomen). Es wird angenommen, daß es sich letztlich um eine durch T-Zellen vermittelte Autoimmunkrankheit handelt (Valdimarsson et al., 1997).

Für die Prädisposition zur Psoriasis wird ein genetischer Defekt verantwortlich gemacht, dessen Erbgang nicht einfachen Mendelschen Gesetzen unterliegt.

Autosomal-dominante Vererbung mit reduzierter Penetranz und polygenetische Vererbung sind bekannte Konzepte (Van de Kerkhof et al., 1995).

Seit 1998 gibt es Hinweise auf eine Assoziation von HPV mit Psoriasis. Stark et al. stellten in Untersuchungen mit HPV8-ELISA eine überraschend hohe Antikörperprävalenz von 43% bei PUVA behandelten Patienten fest. PUVA-Therapie ist eine in schweren Fällen angewandte Behandlung mit UVA-Bestrahlung in Kombination mit Psoralen-Gabe. Favre et al. stellten eine Antikörper-Prävalenz von 25% mit Hilfe eines HPV5-ELISAs fest (2000). HPV-DNA wurde in 80-90% der Läsionen nachgewiesen, wobei die HPV-Typen 5, 36 und 38 dominierten (Favre et al., 1998; Weissenborn, 1998). 1999 konnten Ramoz et al. die Kollokalisierung eines Psoriasis-assoziierten Locus mit einem Suszeptibilitätsloкус für EV auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 zeigen. Dies führte zu der Spekulation, daß unterschiedliche Defekte desselben Gens bei beiden Krankheiten eine Rolle spielen könnten.

### 1.3. Diagnostik von Papillomvirus-Infektionen

Ein Großteil der kutanen oder im äußeren Genitalbereich vorkommenden, durch HPV induzierten Läsionen, (z.B. Vulgärwarzen, Condylomata acuminata) können anhand der Klinik diagnostiziert werden. Dementgegen erfolgt die Diagnose von Schleimhautinfektionen hauptsächlich durch Labormethoden. Da ein Großteil der zervikalen HPV-Infektionen klinisch unauffällig ist und die persistierende zervikale Infektion mit hr-HPV-Typen mit der Entwicklung von Zervixkarzinomen assoziiert ist, wurden verschiedene Methoden zur Diagnose genitaler HPV-Infektionen entwickelt und angewandt. Prinzipiell anwendbare Methoden zur Diagnose von HPV-Infektionen können wie folgt eingeteilt werden:

1. Zytologische und histologische Methoden (morphologische Methoden)
2. Methoden zum Nachweis von HPV-spezifischer DNA
3. Immunozytochemische Methoden
4. Elektronenmikroskopische Methoden
5. Serologische Methoden

In der praktischen diagnostischen Anwendung spielen dabei momentan nur die unter 1. und 2. genannten Methoden eine Rolle.

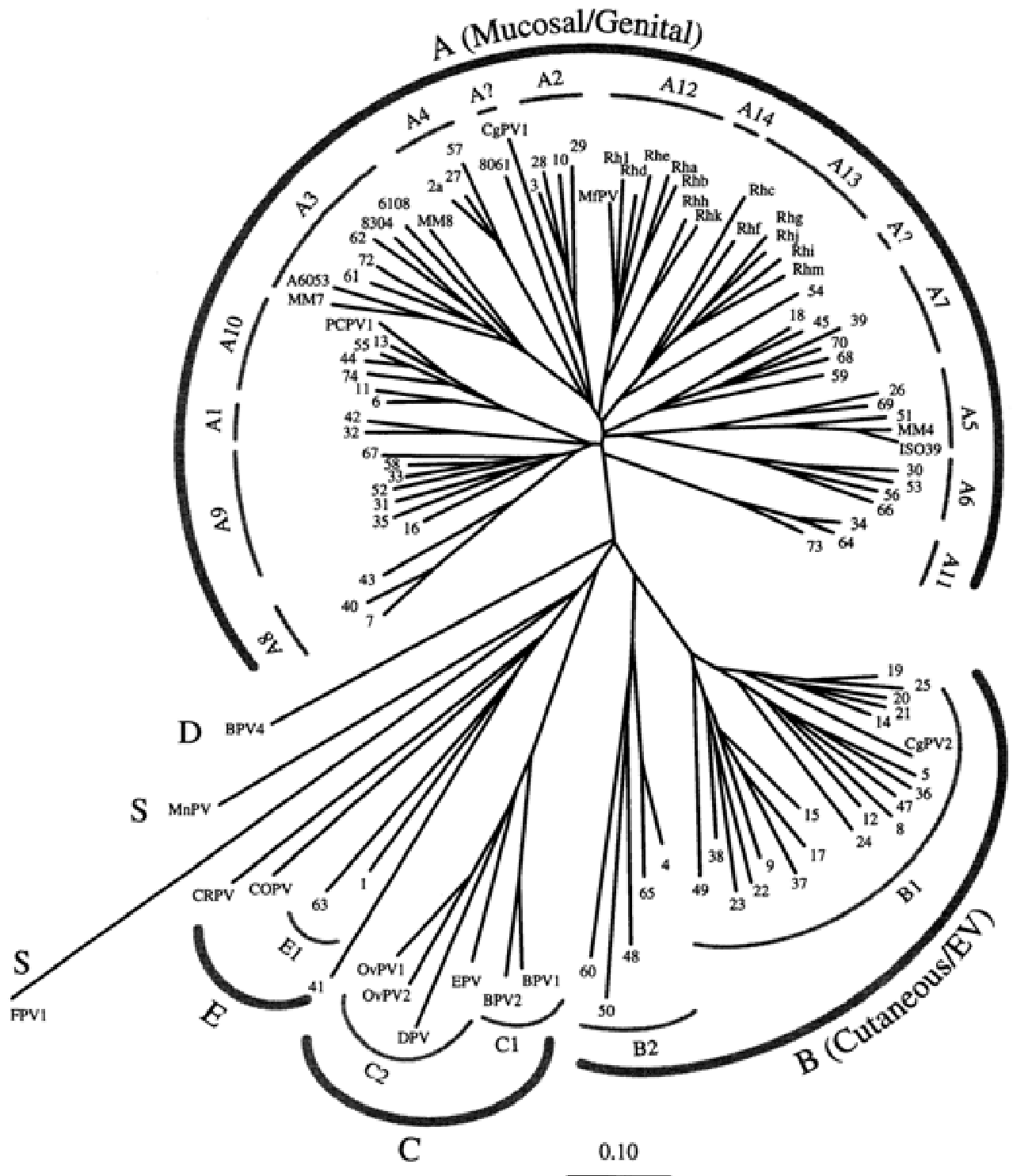


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum von 106 Papillomviren (L1-Gen-Sequenzen)  
(Myers et al., 1997).



### 1.3.1. Morphologische Diagnose von HPV-Infektionen

Kolposkopie, Zytologie (abgeschilferte Zellen) und Histologie (Gewebebiopsien) sind Möglichkeiten für die indirekte Diagnostik von symptomatischen HPV-Infektionen. In der klinischen Routine nimmt neben den Labormethoden, die Kolposkopie einen wichtigen Platz in der morphologischen Diagnose von genitalen HPV-Infektionen ein. Die zytologische Beurteilung zervikaler Abstriche erfolgt mit Hilfe der Klassifikation nach Papanicolaou (Pap I-V, siehe Tabelle 3) oder nach dem „Squamous Intraepithelial Lesions“-Konzept („Low grade SIL“, entspricht Pap IIID; „High grade SIL“, entspricht Pap IV/V). Der Zusammenhang zwischen der zytologischen Beurteilung zervikaler Abstriche nach der Klassifikation nach Papanicolaou und nach dem „Squamous Intraepithelial Lesions“-Konzept ist in Tabelle 4 dargestellt.

negativ	I	normales Zellbild
	II	entzündliche, regenerative, metaplastische oder degenerative Veränderungen, Hyper- und Parakeratosezellen
zweifelhaft	III	schwere entzündliche oder degenerative Veränderungen und/oder schlecht erhaltenes Zellmaterial, Dysplasie, Carcinoma in situ oder invasives Karzinom nicht auszuschließen; abnorme Drüsen und Stromazellen des Endometriums nach der Menopause
	IIID	Zellen einer Dysplasie leichten bis mäßigen Grades
positiv	IVa	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ
	IVb	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ, invasives Karzinom nicht sicher auszuschließen
	V	Zellen eines invasiven Zervixkarzinoms oder anderer maligner Tumoren

**Tabelle 3:** Zytodiagnostik nach Papanicolaou.

Pap-Klassifikation		Bethesda Klassifikation
<b>Pap I</b>	normal	<b>normal</b>
<b>PapII</b>	entzündl. etc.	<b>normal</b>
<b>PapIIw/III</b>	unklar	<b>ASCUS</b>
<b>Pap IIID:</b>	<u>leichte</u> Dysplasie	<b>LSIL</b>
	<u>mäßige</u> Dysplasie	<b>HSIL</b>
<b>Pap IVa</b>	schwere Dysplasie,CIS	<b>HSIL</b>

**Tabelle 4:** Korrelation der zytologischen Beurteilung zervikaler Abstriche nach der Klassifikation nach Papanicolaou (Pap) und nach dem „Squamous Intraepithelial Lesions“-Konzept (SIL).

Zervikale Biopsien werden histologisch entsprechend dem „zervikalen intraepithelialen Neoplasie“ Konzept (CIN I-III, leichte, mittelschwere bzw. schwere Dysplasie/Karzinoma in situ) eingeteilt (Walboomers, 1994; IARC, 1995). Falls Zytologie und Histologie diskrepante Ergebnisse liefern, überwiegt die Histologie und die Zytologie muss entsprechend korrigiert werden (Tabelle 5). Typische Veränderungen HPV-infizierter Plattenepithelzellen, sind so genannte Koilozyten, die sich durch perinukleäre klare Zonen und eine erhöhte Dichte des umgebenden Plasmasaums auszeichnen (Kiviat et al., 1992). Diese Veränderungen sind sowohl in abgeschilferten Zellen, als auch in Gewebebiopsien nachweisbar. Einige Nachteile morphologischer Untersuchungen bezüglich der Diagnose von HPV-Infektionen sowie von zervikalen Dysplasien/Karzinomen sind zum einen die nicht sehr hohe Sensitivität sowie die Tatsache, daß bei positiven morphologischen Ergebnissen keine Differenzierung zwischen Ir- und hr-HPV Typen möglich ist. Weiterhin wurde von einer geringen Intra- und Inter-Untersucher Reproduzierbarkeit der zytologischen und histologischen Untersuchungen berichtet (Walboomers, 1994; Lorincz, 1996). In

Metaanalysen zur Verlässlichkeit von Pap-Tests für den Nachweis von hochgradigen Läsionen, wurden Sensitivitäten zwischen 25 und 85% und Spezifitäten zwischen 30 und 91% festgestellt (Nanda et al., 2000).

Histologie	Zytologie
CINI	IIID/LSIL
CINII	IIID/HSIL
CINIII	IVa/b/HSIL
invas. Ca	V/invas. Ca

**Tabelle 5:** Zusammenhang der histologischen Beurteilung zervikaler Biopsien nach dem Konzept der „zervikalen intraepithelialen Neoplasie“ (CIN I-III) und nach Klassifikation nach Papanicolaou (Pap).

### 1.3.2. Nachweis von genomischer HPV-DNA

Methoden zum Nachweis genomischer HPV-DNA können grundsätzlich in zwei Gruppen eingeteilt werden:

1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR): Die DNA wird vor dem Nachweis amplifiziert.
2. Hybridisierungs-Tests ohne vorherige Amplifikation der DNA, wie z.B. Southern Blot (SB), in-situ Hybridisierung (ISH), Filter in-situ Hybridisierung (FISH) und kommerziell erhältliche Tests für die direkte Hybridisierung.

In der Diagnostik heutzutage hauptsächlich genutzte Tests, sind die PCR und die direkte Hybridisierung, z.B. der Hybrid Capture ® (HC) Test. Im Gegensatz zu anderen Methoden der HPV-Diagnostik, haben sie eine erhöhte Sensitivität (PCR) oder sind technisch leicht durchführbar (z.B. Hybrid Capture ®Test) (Lorincz, 1996).

### 1.3.2.1. Qualitative PCR

Die verschiedenen heute bekannten PCR Protokolle ermöglichen den hochsensitiven Nachweis fast aller bekannten HPV-Typen. Bereits 1-10 virale Genom-Kopien werden unter Verwendung entsprechend sensitiver PCR-Protokolle erfasst (Wieland et al., 1996). Unter den vorhandenen Methoden zum Nachweis humaner Papillomviren, besitzt die PCR die höchste Sensitivität. Unterschiedliche Studien zeigten, daß die Sensitivität der PCR für den Nachweis von Zervikalkarzinomen über 95% liegt, wenn man die Histologie als Referenztest wählt (Walboomers et al., 1999a; Lungu et al., 1995).

### 1.3.2.2. Quantitative PCR

Für viele Krankheiten konnte ein Zusammenhang zwischen der Menge des krankheitsauslösenden Agens und der Schwere der Krankheit festgestellt werden. In den letzten Jahren haben daher quantitative Messungen der Virusspiegel Einzug in die virologische Diagnostik erhalten. So werden HIV-RNA-Spiegel-Bestimmungen zur Diagnose des Krankheitsstatus und insbesondere zur Kontrolle des Therapieerfolgs routinemäßig eingesetzt.

Bisher beschränkte man sich bei der quantitativen PCR-Analyse entweder auf die bloße Abschätzung der Amplifikat-Mengen aus der Gelelektrophorese, oder es wurden mehrere Ansätze in Gegenwart einer konkurrierenden Kompetitor-Amplifikation durchgeführt, um das Target gegen die bekannte Kompetitormenge auszutitrieren. Kürzlich wurden durch die Kombination Fluoreszenz-basierter Detektion und der PCR, Techniken entwickelt, die eine kontinuierliche Bestimmung der Amplifikatmenge erlauben und dadurch eine viel einfachere Bestimmung der Templatmenge ermöglichen. Die Anzahl von PCR-Zyklen zur Erreichung einer bestimmten Produktmenge verhält sich über weite Bereiche proportional zur Menge des Ausgangsmaterials. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um reaktionsabhängig fluoreszente Signale zu erzeugen. Am einfachsten ist die Verwendung eines Farbstoffes, der an doppelsträngige DNA bindet und dann fluoresziert (Ethidiumbromid, SYBR Green). Allerdings ist das Signal nicht ausreichend spezifisch, da diese Farbstoffe auch Primer-Dimere und unspezifische Amplifikate detektieren. Die benachbarte Bindung zweier einfach Fluorophor-markierter Sonden auf einem Templat z. B., erlaubt eine sequenzspezifische Bestimmung der Ausgangsmenge. Durch die Bindung innerhalb des Amplimers, werden die Sonden

in räumliche Nähe gebracht und es kommt über den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zu einer Emission des Fluoreszenzsignals des Akzeptorfarbstoffes. Die Ausgangsmenge einer Probe kann dann durch Vergleich mit externen Standards quantifiziert werden.

## 1.4. Zielsetzung

Zahlreiche epidemiologische und molekularbiologische Untersuchungen haben sich mit der Rolle von HPV in der Ätiologie epithelialer Tumoren beschäftigt. Bis heute gibt es jedoch nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Bedeutung der Viruslast für die Pathogenese beschäftigen.

Daher war das erste Ziel dieser Arbeit die Entwicklung und Etablierung verlässlicher Protokolle zur Bestimmung von HPV-DNA-Lasten. Dabei wurde mit der innovativen Methode der Echtzeit-PCR im Sondenhybridisierungsformat gearbeitet. Da bei HPV-Infektionen die virale DNA zum Teil nur in sehr kleinen Kopienzahlen vorliegt und regelmäßig Infektionen mit multiplen HPV-Typen beobachtet werden, war es notwendig Protokolle zu etablieren, die eine sowohl sensitive, als auch typspezifische Quantifizierung erlauben. Um diese Forderungen erfüllen zu können, sollten für jeden HPV-Typ sowohl individuelle Primer als auch individuelle Sonden entworfen werden. Diese Primer-Sondenkombinationen sollten in Versuchsreihen optimiert werden. Besonderer Wert wurde auf die Verlässlichkeit der Quantifizierung in Gegenwart koinfizierender HPV-Typen, die Reproduzierbarkeit der Messwerte bei wiederholter Quantifizierung, die klinische Reproduzierbarkeit und die Robustheit der Protokolle bei kleinen Variationen der Konzentrationen von Magnesiumchlorid, der Primer und der dNTPs, gelegt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten HPV-DNA-Last-Bestimmungen in Biopsiematerialien verschiedener tumoröser und nicht-tumoröser, HPV-assoziiierter Erkrankungen durchgeführt werden. Dabei sollte vor allem die Viruslast in pathologisch verändertem und gesundem Gewebe verglichen werden. Ein besonderes Augenmerk galt ferner den möglicherweise unterschiedlichen Virusspiegeln in den gutartigen Läsionen der Psoriasis und malignen Tumoren der Haut. Als Gruppe mit etablierter HPV-Ätiologie sollten im Rahmen einer prospektiven Studie zervikale Abstriche mit typspezifischen, quantitativen Echtzeit-PCR-Protokollen für verschiedene genitale Hochrisiko HPV-Typen untersucht werden. Da der klinische Verlauf von HPV-Infektionen hauptsächlich durch die zelluläre Immunantwort bestimmt wird, sollte mit besonderem Hinblick auf den HIV-Status und die damit verbundene Immunsuppression festgestellt werden, ob die Höhe der HPV-Spiegel mit dem Grad der Immunsuppression korreliert und sich von der immunkompetenter, HIV-negativer Frauen unterscheidet. Weiteres Interesse galt der Frage, ob eine Korrelation zwischen den initialen HPV-Spiegeln bei Frauen mit normaler Zytologie

oder niedriggradigen Dysplasien und dem weiteren Krankheitsverlauf besteht.

Im dritten Teil der Arbeit sollte HPV-DNA im morphologischen Kontext nichtmelanozytärer Tumoren der Haut nachgewiesen werden. Da dies bislang bei Tumoren der Haut, die nicht von EV-Patienten stammen, noch nicht gelungen war, sollte hierzu ein hochsensitives, in-situ-Hybridisierungs-Protokoll nach der Tyramid-Signal-Amplifikations-Methode etabliert werden. Weiterhin sollten RT-PCR-Protokolle für den hochsensitiven Nachweis des E6-Onkogentranskripts von kutanen HPV-Typen entwickelt und angewandt werden.

## II. MATERIAL

### 2.1. Patientenmaterial

#### 2.1.1. Proben von Basaliomen, Plattenepithelkarzinomen der Haut und autologer gesunder Haut

Das Gewebematerial wurde uns von Dr. Andreas Ritzkowsky (Hautklinik des Universitätsklinikums zu Köln) zur Verfügung gestellt. Insgesamt lagen für diese Studie 61 Probenpaare gesunder Haut und nichtmelanozytärer Tumoren (7 aktinische Keratosen (AK), 4 MB (Morbus Bowen), 36 Basaliome (BCC), 14 Plattenepithelkarzinome (PEC)) vor. Die HPV-Prävalenzen dieses Kollektivs sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Außerdem lagen zwei periorale und faziale Warzen, in denen sich HPV7-DNA nachweisen ließ, vor.

Probenpaare		HPV-DNA positiv n (%)		
		norm. Haut	Tumor	Probenpaare
AK	n = 7	6 (86)	7 (100)	6 (86)
MB	n = 4	2 (50)	2 (50)	2 (50)
BCC	n = 36	10 (28)	11 (31)	8 (22)
PEC	n = 14	3 (21)	4 (29)	1 (7)

**Tabelle 6:** HPV-Prävalenz in den untersuchten Probenpaaren.

#### 2.1.2. Haut, Haarproben und Schuppen von Psoriatikern

Das Gewebematerial wurde uns von Prof. Dr. Elke Grussendorf-Conen (Hautklinik der RWTH, Aachen) zur Verfügung gestellt. Insgesamt lagen für diese Studie von 125 Psoriasis-Patienten Biopsate der psoriatischen Hautläsionen vor. Dabei handelte es sich um äußere Hautschuppen, die aus psoriatischen Läsionen mit dem Skalpell vorsichtig abgehoben wurden (sog. shaved Biopsies). Weiterhin lagen von 85 Patienten, vorsichtig mit dem Skalpell abgeschabte, Hautschuppen unauffälliger (normaler) Haut vor (Abb. 3). Die Patientengruppe umfasste 73 Männer mit einem mittleren Alter von 46,0 Jahren (Spannweite 8-80 Jahre, Stabw. 15,9) und 52 Frauen mit einem mittleren Alter von 52,1 Jahren (Spannweite 16-80, Stabw. 18,9).





**Abbildung 3:** Entnahme von Hautschuppen unauffälliger Haut bei einer Psoriasispatientin durch vorsichtiges Abschaben.

### 2.1.3. Zervixabstriche und Biopsate

Alle Zervixabstriche wurden von Dr. Anna-Maria Funke (Frauenklinik der Universität zu Köln) gesammelt. Die Proben der HIV-positiven Patientinnen stammten von Frauen der HIV-Sprechstunde, die der HIV-negativen Patientinnen von Frauen der Dysplasie-Sprechstunde, die dorthin aufgrund eines Dyplasieverdachts überwiesen worden waren. Alle Patientinnen wurden durch einen Untersucher (AMF) komplett gynäkologisch untersucht. Von HIV-positiven Patientinnen wurde zusätzlich die Anzahl der CD4-Zellen/ul und die HIV-1 RNA-Last im Plasma (Kopien/ml) (Cobas Amplicor HIV-1 Monitor 1.5, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) bestimmt. Die Einteilung der Patientinnen in HIV-Stadien erfolgte gemäß der CDC-Klassifizierung (Centers for Disease Control and Prevention, 1993). Weiterhin wurden Daten zur aktuellen antiretroviralen Therapie gesammelt. Nach der Kolposkopie wurden Zervixabstriche für die zytologische Untersuchung und die HPV-Tests entnommen. Die Zytologie wurde sowohl nach Papanicolaou (Münchener Nomenklatur II; Pap I – V) (Soost et al., 1990), als auch nach dem, im angelsächsischen Bereich üblichen,

Bethesda-System klassifiziert (Luff, 1992; Kurman et al., 1994). Der Großteil der PapIII/HSIL- (CIN2) und alle PapIV/HSIL (CIN3) und Zervixkarzinom-Diagnosen wurden histologisch, mit kolposkopisch entnommenen Biopsien, bestätigt. 353 Zervixabstriche von 152 HIV-positive Frauen mit den zytologischen Klassen wurden auf HPV-DNA untersucht: normal (n=212), „atypical squamous cells of undetermined significance“ (ASCUS, Pap2w) (n=18), low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL, PapIII/HSIL mit milder Dysplasia) (n=37), high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL, PapIII/HSIL mit moderater Dysplasia und Pap IVa/b) (n= 85), invasives Zervixkarzinom (Pap V) (n=1). Von 285 HIV-negativen Frauen, lagen 349 Zervixabstriche der Klassifizierung normal (n=196), ASCUS (n=32), LSIL (n=33), HSIL (n=85) und Zervixkarzinom (n=3) zur Untersuchung vor. Das mittlere Alter der HIV-positiven und HIV-negativen Patienten, beim ersten Besuch, betrug 32,5 (Spannweite 17,0-64,2, Standard Abweichung (Stabw) 6,7) bzw. 33,2 (Spannweite 15,8-72,9, Stabw. 9,7). Die Altersverteilung bei den Abstrichen unterschiedlicher zytologischer Kategorien, bei HIV-positiven und HIV-negativen Patientinnen, war vergleichbar. Die HPV-DNA-Prävalenz in Zervixabstrichen von HIV-negativen Patientinnen lag bei 63,9% (223/349), bei HIV-Infizierten bei 70,5 % (249/353). Mit ansteigendem zytologischen Grad, stieg die HPV-DNA-Prävalenz in Zervixabstrichen von HIV-negativen, bzw. HIV-positiven Patientinnen von 45,4% und 57,1% bei Normalen, auf 68,8% und 61,1% bei ASCUS, 81,8% und 89,2% bei LSIL, 96,5% und 97,6% bei HSIL und 100% bei Zervixkarzinomen. Die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 45 oder 56 wurden mit ansteigender Häufigkeit in Abstrichen mit normaler Zytologie, von 19,1% bzw. 24,4% bis 79,8% bzw. 79,0%, in Abstrichen mit HSIL, bei HIV-negativen und HIV-positiven Frauen gefunden.

## 2.2. Chemikalien

AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
BSA (20 mg/ml; nicht-acetyliert; wässrige Lösung)	Sigma, Deisenhofen
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma, Deisenhofen

DNA Typing Grade Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol (99,8%)	Carl Roth GMBH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendinitrioloessigsäure (EDTA); 0,5M; pH 8,0	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd ( $\geq 35\%$ )	Carl Roth GMBH, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma, Deisenhofen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	Merck, Darmstadt
Human placental-DNA	Sigma, Taufkirchen
Kaisers Glyceringelantine	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhypochlorit-Lösung	DYNAL, Oslo, Norwegen
NuSieve 3:1 Agarose	FMC Bio Products, Rockland, ME, USA, Alleinvertrieb in Deutschland durch Biozym, Hameln
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
RNase Inhibitor	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Salmon-Sperm-DNA (10 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Sybr Green	Applied Biosystems, USA
tri-Natriumcitrat-2-Hydrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> •2H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Tween-20 (Polysorbat 20)	Sigma, Deisenhofen
Zitronensäure-Monohydrat (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> •H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt

## 2.3. Enzyme und Proteine

### 2.3.1. DNA-Polymerasen

Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	Pharmacia Biotech, Freiburg

### 2.3.2. Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI und die dazugehörigen Puffersysteme, wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

### 2.3.3. Modifizierende Enzyme

Proteinase K mit mitgeliefertem 10x Puffer      Qiagen, Hilden  
(500 mM Tris-HCl (pH 8,5)  
10 mM EDTA)

RNase A mit mitgeliefertem Puffer                      50 mM Tris/HCl (pH 8.0)  
   10 mM EDTA  
   5 % Tween 20

## 2.4. Nukleinsäuren

### 2.4.1. Vektoren

pCR<sup>®</sup>-Blunt      pCR<sup>®</sup>-Blunt ist ein Klonierungsvektor (3513bp), der die direkte  
(Invitrogen,      Selektion von positiven Rekombinanten durch die Unterbrechung  
CA, USA)      des konstitutiv exprimierten Letalgens *ccdB* (control of cell death)  
ermöglicht. Das Letalgen *ccdB* wird als Fusionsprotein mit dem C-  
Terminus von LacZ $\alpha$  exprimiert und steht unter der Kontrolle des  
P<sub>lac</sub> -Promotors. Der rekombinante pCR<sup>®</sup>-Blunt wird in einem *E.*  
*coli*-Typ ohne *lac*- Repressor repliziert. Der Vektor enthält  
weiterhin Kanamycin und Zeozin<sup>™</sup> Resistenzgene zur Selektion in  
*E. coli*, sowie eine Klonierungsstelle, drei M13-Universal-Primer,  
Stellen zur Sequenzierung und den ColE1-  
Replikationsursprungspunkt.

### 2.4.2. HPV-Referenz-Plasmide

Für Verdünnungsreihen und als Matrize für die Synthese von Sonden für die in-situ Hybridisierung wurden klonierte HPV-Genome verwendet (Tabelle 7)

HPV-Typ	Zitat
5	(Kremsdorf et al., 1982)
7	(Oltersdorf et al., 1986)
8	(Pfister et al., 1981)

HPV-Typ	Zitat
16	(Seedorf et al., 1985)
18	(Boshart et al., 1984)
20	(Kremsdorf et al., 1984)
31	(Lorincz et al., 1986)
33	(Beaudenon et al., 1986)
36	(Kawashima et al., 1986)l
38	(Scheurlen et al., 1986)
45	(Naghashfar et al., 1987)
56	(Delius et al., 1994)

**Tabelle 7:** Übersicht der verwendeten HPV-Referenz-Plasmide.

## 2.5. Oligonukleotide

Sämtliche als PCR-Primer oder Sequenzierprimer verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurogenetec (Seraing, Belgien) bezogen oder entstammen Reagenzien-Kits. Alle als Sonden verwendeten Oligonukleotide wurden von TIB MolBiol (Berlin) bezogen oder entstammen Reagenzien-Kits.

### 2.5.1. PCR-Primer

#### 2.5.1.1. Primer für die reverse Transkription

Oligo-dT <sub>23</sub> -Primer	Sigma, Deisenhofen
Zufallsnonamer-Primer	Sigma, Deisenhofen

### 2.5.1.2. Sequenzierprimer

Funktion	Oligonukleotidsequenz* 5' → 3'	Bindestelle
M13 Forward Sequenzung (-20) Primer	GTA AAA CGA CGG CCA G	Pos. 427-442 pCR®-Blunt
M13 Reverse Sequenzung Primer	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Pos. 205-221 pCR®-Blunt
CP66 Sequenzier- Primer der Nested-PCR-Amplimere	AAT CAR MTG TTT RTT ACW GT	Pos. 6862-6881 im HPV8-Genom (Fuchs <i>et al.</i> , 1986)

**Tabelle 8:** Sequenzierprimer

\* In den Sequenzen verwendete IUB-Codes: Y = C/T; R = A/G; M = A/C; W = A/T

### 2.5.2. DNA-Längenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese

1 kb DNA-Leiter (GIBCO BRL):	zur Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Fragmente von 500 bp bis 12 kb (enthält folgende Fragmente: 12216 bp, 11198 9162 bp, 8144 bp, 7126 bp, 6108 bp, 5090 bp, bp, 2036 bp, 1636 bp, 1018 bp, 506 bp)
λ-HindIII-Leiter (GIBCO BRL):	zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung linearer doppelsträngiger DNA von 125 bp bis 23 kb (die komplette Restriktion von λ-DNA mit HindIII ergibt folgende Fragmente: 23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp)
Marker VIII Boehringer, Mannheim	zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung linearer doppelsträngiger DNA von 125 bp bis 23 kb (enthält folgende Fragmente: 1114 bp, 900 bp, 692 bp, 501 bp, 489 bp, 404 bp, 320 bp,

242 bp, 190 bp, 147 bp, 124 bp, 110 bp, 67  
bp, 37 bp, 34 bp (2x), 26 bp und 19 bp)

## 2.6. Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

Für einige Standardreaktionen/-verwendungen der Molekularbiologie werden Reagenziensätze angeboten. Es wurden folgende gebrauchsfertige Reagenziensysteme eingesetzt:

Biotin-Nick-Translation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
LightCycler-Control Kit DNA	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Omniskript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen
Omniskript Rt Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Tissue Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep8 Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
QIAspin PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TSA Biotin System (NEL700)	Perkin Elmer Life Sciences, Inc., Boston, USA
Zero Blunt PCR Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande

## 2.7. Bakterienkultur

### 2.7.1. Bakterienstämme

Der verwendete Stamm von *E.coli* hatte folgenden Genotyp:

One Shot Top 10	$F^-$ , <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15
Competent Cells	Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)</i> 7697 <i>galU</i>
(Invitrogene)	<i>rpsL endA1 nupG</i>

### 2.7.2. Medien und Zusätze für Bakterienkulturen

Luria Bertani(LB)-Medium	20 g LB-Broth-Base/l Aqua bidest., 15 min bei 121°C autoklavieren, Lagerung bei 4°C
--------------------------	---

LB-Agar	32g LB-Agar/l Aqua bidest., 15 min bei 121°C autoklavieren, Agar auf 50°C abkühlen lassen und in Plastikpetrischalen gießen; die abgekühlten Platten wurden bei 4°C gelagert
---------	--

Kanamycin-Stammlösung	20 mg in 1 ml Aqua bidest. lösen, anschließend steril filtrieren
-----------------------	--

Ampicillin- Stammlösung	20 mg in 1 ml Aqua bidest. lösen, anschließend steril filtrieren
-------------------------	--

Zur Selektion wurden 200 µg Kanamycin bzw. 100 µg Ampicillin-Lösung/ml LB-Agar bzw. Medium zugegeben.



## 2.8. Puffer und Lösungen

### 2.8.1. Puffer für die Agarose Gelelektrophorese

50x TAE	2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA
Probenpuffer 10x/Farbmarker	5 ml Glycerin, 3 ml 5%ige Bromphenol- blau-lösung, 3 ml 5%ige Xylen-Cyanol- Lösung, 0,2 ml 50x TAE, 1,3 ml H <sub>2</sub> O
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml Aqua bidest.

## 2.9. Software

Blast-Search	NCBI
Easy Image Plus	Herolab Wiesloch
LightCycler Software (Version 3.1.102)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Mac Vector 6.0	Oxford Molecular Group PLC, 1996
SPSS 10.0.7	SPSS Inc., IL, USA

## 2.10. Laborgeräte

Biometra Trio Thermocycler	Biometra. Göttingen
Elektrophorese-Kammern für Agarose- Horizontalgele	Biotech Fischer
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf Hamburg
Heizplatte OMNILAB PST100	Jürgens, Darmstadt
Inkubator B5061 EC-CO <sub>2</sub>	Heraeus, Hanau
Kryotom CM3000	Leica, Nußloch
Kodak M35 X-OMAT Processor	Kodak, Rochester, NY, USA
LightCycler	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Magnetrührer Ikamag RCT	IKA-Labortechnik, Staufen i. Brsg.

Mikrodissektionssystem, bestehend

aus:

Robot-Mikrobeam Systems

PALM, Wolfratshausen,  
Deutschland

Carl Zeiss, Oberkochen,

Mikroskop, invertiert: Axiovert 135

Deutschland

Netzgerät Phero-Stab 200/300

Biotech Fischer

Photometer:

Pharmacia Gene Quant RNA/DNA  
Calculator

Pharmacia Biotech, Freiburg

Umkehrmikroskop Diavert

Leitz, Wetzlar

UVIKON 9x2 Spectrophotometer

Kontron Instruments,  
Neufahrn

Pipettierhilfe:

Eppendorf Reference Pipetten  
Multipette 4780

Eppendorf  
Eppendorf

Vortexer REAX2000

Heidolph Elektro GmbH,  
Kelheim

Wasserbäder:

GFL-Wasserbad  
Julabo 12 B

GFL, Burgwedel  
Julabo, Seelbach

Zentrifugen:

Tischzentrifugen:

Biofuge 13  
Eppendorf Zentifuge 5415 C  
Pico Fuge

Heraeus Sepatech, Osterode  
Eppendorf  
Stratagene, La Jolla, CA,  
USA

Kühlzentrifuge Sigma-Zentrifuge  
2K15

Sigma, Deisenhofen

## III. METHODEN

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Standardmethoden der Molekularbiologie, wie in Sambrock et al. (2001) angegeben, durchgeführt. Methoden, die auf kommerziellen Kits beruhen wurden, sofern nicht anders vermerkt, nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

### 3.1. Isolation von DNA aus Patientenmaterialien

#### 3.1.1. Deparaffinisierung des Patientenmaterials

Die in Paraffin eingebetteten Biopsien ( $\sim 3\text{-}4\text{mm}^3$ ) wurden mit einem Einmalskalpell in kleine Stücke geschnitten und in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Das Gewebe wurde mit 1 ml n-Oktan pro Biopsie unter Schütteln (RT/30 min) entparaffiniert. Anschließend wurde 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und verworfen. Die Behandlung mit n-Oktan wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die deparaffinierten Gewebestückchen mit 500µl Ethanol p.a. gewaschen und 5 min bei 13000U/min zentrifugiert. Nach dem Abziehen des Überstandes wurde der Vorgang mit 500µl 70%igem Ethanol wiederholt und abschließend die verbleibenden Ethanolreste im Thermoblock bei 55°C verdampft.

#### 3.1.2. DNA-Extraktion aus Genitalabstrichen

Das in Transportmedium (PBS mit 0,05% Merthiolat) gelieferte Abstrichmaterial wurde durch Vortexen gründlich durchmischt. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1000g wurde der Überstand verworfen und das Zell-Pellet in 180µl PBS aufgenommen und entsprechend der Kitvorschrift weiterverarbeitet. Die Elution erfolgte mit 200 µl TE-Puffer.

#### 3.1.3. DNA-Extraktion aus Biopsien

Frische Biopsien und in Paraffin eingebettete Biopsien wurden mit dem „Qiamp Tissue Kit“ (Qiagen) aufgereinigt. In Paraffin eingebettete Biopsien wurden vor der Aufarbeitung mit Hilfe von Xylol entparaffiniert (3.1.1.). Von den Biopsien konnten bis zu 25 mg zur Aufarbeitung eingesetzt werden. Die frischen Biopsien wurden dazu mit

sterilen Einmalskalpellen in kleine Stücke geteilt und entsprechend der Kitvorschrift weiterverarbeitet. Die Elution erfolgte mit 200 µl TE-Puffer.

#### **3.1.4. DNA-Extraktion aus mikrodisseziertem Material**

Mikrodisseziertes Gewebe (3.13.) wurde in einem Tropfen (0.5µl) TE-Puffer (pH 8,0) mit 400µg Proteinase K/ml aufgefangen und anschließend mit weiteren 16µl dieses Verdauansatzes versetzt. Nach Zentrifugation (3000g; ~15s) wurde das Gemisch über Nacht bei 62°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch zehnminütige Inkubation bei 95°C inaktiviert. Nach kurzem Vortexen war die DNA bereit für die weitere Verwendung.

### **3.2. Isolation von RNA aus Patientenmaterialien**

Die frischen Biopsien wurden mit sterilen Einmalpistillen der Firma Eppendorf unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in 1,5ml Eppendorfgefäßen gemörsert. Sobald eine ausreichende Zerkleinerung erreicht wurde, erfolgte die Isolation der RNA mit dem „RNAeasy Mini Kit“ (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben, unter Verwendung von QiaShredder und DNase-Verdau. Die Elution erfolgte mit 30µl RNase-freiem Wasser.

### **3.3. Aufreinigung von PCR-Produkten**

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte abhängig von dem Ergebnis der Agarosegelelektrophorese. Fand sich im Agarosegel eine singuläre Bande, so erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem „Qiaquick PCR Purifikation Kit“ (Qiagen) über Säulen, entsprechend den Herstellerangaben. Das gereinigte Amplimer wurde mit TE-Puffer (30 µl) eluiert. Fanden sich im Agarosegel multiple Banden, so wurde mit dem „Qiaquick Gel Extraktion Kit“ (Qiagen) gearbeitet. Zuerst wurde dabei das DNA-Fragment mit einem neuen Einmalskalpell aus dem Gel herausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt, gewogen und anschließend entsprechend den Herstellerangaben weiterverarbeitet. Das gereinigte Amplimer wurde mit TE-Puffer (30 µl) eluiert.

### 3.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmidpräparation wurde mit dem „QIAprep8 Plasmid Kit“-Reagenzsystem der Firma Qiagen durchgeführt und basiert auf der alkalischen Extraktionsmethode nach Birnboim und Doly (1979). Die Plasmid-DNA wurde in 150µl TE-Puffer eluiert.

### 3.5. Photometrische DNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die DNA-Präparation in TE-Puffer verdünnt und ihre Absorption im UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) gemessen. Bei Messungen mit besonderen Anforderungen an die Genauigkeit, wurde die Messung mehrfach wiederholt, an verschiedenen Verdünnungsansätzen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Für die Auswertung der Absorptionswerte gilt:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 50 \times 1/\text{Verdünnungsfaktor}$$

Als Kriterium für die Verunreinigung der Präparation mit Proteinen oder RNA wurde der Quotient der Absorptionen bei 260nm (DNA) und 280nm (Proteine) bestimmt. Dabei wurde angenommen, daß bei einem  $A_{260} : A_{280}$ -Verhältnis zwischen 1,8 und 1,95 reine DNA, bei Werten kleiner als 1,8 DNA mit Protein-Verunreinigungen und bei Werten größer als 1,95 DNA mit RNA-Verunreinigungen vorliegt (Sambrook J. et al., 2001).

### 3.6. Herstellung von HPV-Plasmid-Verdünnungsreihen

Zur Herstellung von Verdünnungsreihen wurde das Molekulargewicht einer Kopie des HPV-Genoms plus dem das HPV-Genom-tragenden Plasmids zugrunde gelegt. Fünf gleiche Verdünnungen (i.d.R. 1:20) der Plasmid-DNA wurden je fünf mal spektrometrisch quantifiziert. Von diesen wurden je 40µl in einen Pool eingesetzt und dieser, entsprechend der gemittelten Werte der spektroskopischen Messung, mit TE-CT-Puffer auf eine Konzentration von  $5 \times 10^9$  Kopien/µl eingestellt. Um einheitliche Verdünnungsreihen über einen Zeitraum von mehreren Jahren zu gewährleisten, wurden von dieser Ausgangsverdünnungsstufe Aliquots bei -80°C eingelagert. Unter Verwendung von 50µl der Ausgangsverdünnungsstufe und 450µl TE-CT wurde die nächste Verdünnungsstufe hergestellt und so fort. Diese Verdünnungen wurden

aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **3.7. DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzierungen wurden vom Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) durchgeführt. Dabei wurde nach der Taq FS BigDye-Terminator Cycle Sequencing Methode gearbeitet und auf einem ABI Prism™ 377 DNA Sequenzer der Firma Applied Biosystems gemessen. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software McVektor 6.5 bzw. BLAST identifiziert.

### **3.8. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für qualitative und quantitative Analysen, sowie als Synthesemethode für z.B. Hybridisierungssonden eingesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die PCRs entsprechend der Literaturangaben durchgeführt. Zur Gewährleistung maximaler Homogenität der Ansätze wurden Poole angefertigt, die auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt wurden. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch überprüft. Die Produkte der positiven Genital-Typ spezifischer PCR (Wieland et al., 2000a) wurden nach 3.3. gereinigt und nach Jacobs et al. (1997) typisiert.

#### **3.8.1. PCR-Protokolle qualitativer PCRs**

Alle PCRs wurden mit Pharmacia Taq Polymerase und dem dazugehörigen Puffer in 0,2ml Biometra-PCR-Gefäßen in einem programmierbaren PCR-Heizblock (T3 Thermocycler, Biometra) durchgeführt. Die Komposition der Ansätze erfolgte entsprechend der Literatur ( $\beta$ -Globin, (Fredericks et al., 1999); HPV5 und 36 (Favre et al., 1998); genitale HPV-Typen (Pfister, 1996); kutane/EV assoziierte HPV-Typen (Boxman et al., 1997). Die  $\beta$ -Actin-PCR wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden umfangreiche Vorkehrungen gemäß Kwok et al. (1990) getroffen.

### 3.8.1.1. Protokolle der neu etablierten nested-PCR-Protokolle zum Nachweis von mRNA des Onkogens E6 von HPV9, 24 und 38

Zum Nachweis papillomaviraler Sequenzen in den Produkten der nach 3.9. revers-transkribierten RNA-Extrakte aus 3.2. wurden die Primer (4.1.2.1.) in einer Konzentration von 0,5µM, die dNTPs 200mM und MgCL<sub>2</sub> in einer Konzentration von 1,5mM eingesetzt. Es wurden 2.5U der Pharmacia Taq DNA-Polymerase eingesetzt. Als Kontrollen wurden nach 3.6. hergestellte Verdünnungsreihen verwendet. Der innere Teil der nested-PCR wurde mit 3µl der externen PCR durchgeführt. Die Zeit- und Temperaturparameter sind in der folgenden Zusammenstellung angegeben.

Prädenaturierung:	94°C	180s		
Touchdown:	94°C	30s		
	65 <sup>1</sup> /60 <sup>2</sup> C	45s	dT/Zyklus = -1°C	} 15x
	72°C	30s		
Amplifikation:	94°C	30s		} 30x
	50 <sup>1</sup> /45 <sup>2</sup> C	45s		
	72°C	30s		

<sup>1</sup> HPV9- und 24-PCR    <sup>2</sup> HPV38-PCR

### 3.8.2. Allgemeines Protokoll für quantitative PCRs

Quantitative PCRs wurden allgemein, wie in der folgenden Aufstellung angegeben, durchgeführt. Die im Amplifikationsteil angegebene Denaturierungszeit von null Sekunden bedeutet, daß diese Temperatur nur kurz angesteuert wird. Die individuellen Annealingtemperaturen (T<sub>ann.</sub>) und Magnesiumchloridkonzentrationen und Abweichungen vom Standard sind in Tabelle 11 angegeben. Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden in Tabelle 9 bzw. 10. Zur Korrektur von Schwankungen der PCR-Effizienz, der DNA-Qualität und zur Ermittlung der eingesetzten Zellzahl wurde das single-copy Gen β-Globin mit Hilfe des „LightCycler-Control Kits DNA“ entsprechend der Vorschrift quantifiziert. Die Quantifizierung des single-copy Gens β-Globin wurde einfach, die HPV-Bestimmung mindestens doppelt durchgeführt. Zur Berechnung der Viruslast wurden die gemittelten Werte der HPV-

Bestimmung verwendet. HPV-Viruslasten wurden als HPV-Kopie pro  $\beta$ -Globin-Gen-Kopie, bzw. bei sehr kleinen Lasten als eine HPV-Kopie pro x Zelläquivalenten angegeben. Alle Quantifizierungen wurden in einem 20  $\mu$ l Endvolumen durchgeführt. Es wurden 0,8 U Platinum Taq Polymerase pro Ansatz und der mitgelieferte Puffer mit 200  $\mu$ M dNTPs, 0,5% TWEEN-20, 5% DMSO und 500 ng/ $\mu$ l BSA verwendet. Bei HPV-PCRs wurde, für einen stabileren Verlauf der Quantifizierung, zusätzlich 1  $\mu$ l TE-SS (= 40ng Salmon-Sperm-DNA/Ansatz) eingesetzt. Primer wurden 0,25  $\mu$ M und Sonden 0,15  $\mu$ M eingesetzt. In der Regel kamen 2  $\mu$ l der DNA-Extrakte aus 3.1. zum Einsatz. In Einzelfällen, bei zu hohen oder zu niedrigen Konzentration, wurden Verdünnungen, bzw. größere Volumina der DNA-Extrakte verwendet. Quantifizierungen aus mikrodisszeziertem Material wurden mit 7  $\mu$ l aus 3.1.4. durchgeführt und konnten jeweils nur einmal getestet werden. Es wurde jeweils mit Ampuwa auf 20  $\mu$ l aufgefüllt.

#### Prädenaturierung: Cycles 1

Analysis mode: None      Fluorescence Display Mode = F2/1\*

Target Temp. (°C)	Incubation Time (sec)	Temp. Trans. Rate (°C/sec)	2°Target Temp (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	60	20	0	0	0	None

#### Amplifikation: Cycles 45

Analysis mode: Quantification Fluorescence Display Mode = F2/1\*

Target Temp. (°C)	Incubation Time (sec)	Temp. Trans. Rate (°C/sec)	2°Target Temp (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	0	20	0	0	0	None
(T <sub>ann.</sub> )	10	20	0	0	0	Single
72	8	5	0	0	0	None



**Abkühlphase: Cycles 1**

Analysis mode: None Fluorescence Display Mode = F2/1

Target Temp. (°C)	Incubation Time (sec)	Temp. Trans. Rate (°C/sec)	2°Target Temp (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
30	30	20	0	0	0	None

\*bei Verwendung von Sonden mit LC-Red705-Markierung ist hier F3/F1 anzugeben, bei Verwendung von Sybr Green F1/1.

**3.9. Reverse Transkription**

Die unter 3.2. isolierten RNAs wurden nach zwei Methoden revers transkribiert. Dabei wurden je 5µl der RNA-Extrakte eingesetzt. Zum Nachweis einer erfolgreichen Extraktion und reversen Transkription von RNA, wurde das ubiquitär exprimierte Gen  $\beta$ -Aktin durch PCR, unter Verwendung von Primern der Firma Clontech (Heidelberg; Human beta-Actin Control Amplimer Set), verwendet.

**3.9.1 Reverse Transkription mit Oligo-dT<sub>23</sub>-Primern**

Die reverse Transkription wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers der Oligo-dT<sub>23</sub>-Primer (Sigma) unter Verwendung des „Omniskript Reverse Transkriptase“ Kits (Qiagen) durchgeführt.

**3.9.2 Reverse Transkription mit Zufallsnonamer-Primern**

Die reverse Transkription wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers des „Omniskript Reverse Transkriptase“ Kits (Qiagen) unter Verwendung von Zufallsnonamer-Primern (1µM) der Firma Sigma durchgeführt.

**3.10. Herstellung von Kryostatschnitten**

Kryostatschnitte für die in-situ Hybridisierung wurden in einer Dicke von 7µm angefertigt. Nach der Trocknung an der Luft wurden die Schnitte in PBS mit 4% Paraformaldehyd für zehn Minuten fixiert, fünf Minuten mit PBS gewaschen, mit 70%

Ethanol in Wasser vorgetrocknet und schließlich luftgetrocknet. Die Objektträger konnten bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

### **3.11. Sondenmarkierung für die in-situ Hybridisierung**

Die Markierung der Sonden für die in-situ Hybridisierung erfolgte nach Herstellerprotokoll mit dem Biotin-Nick-Translation Mix der Firma Roche. Für die Markierung wurde das klonierte komplette Genom des HPV-Typen 15 und für die potentiell neuen HPV-Typen RTRX 1, 5 und 9 das klonierte und sequenzierte Amplimer der Boxmann-PCR (Boxman et al., 1997) verwendet. Dazu wurde das Amplimer mit BamHI aus dem Vektor freigeschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, exzisiert und gereinigt (3.3.). Zur Überprüfung der Markierung wurde 1µl Probe (konzentriert, 1:10, 1:20) auf Hybond Nylon Membran gegeben und eine Stunde bei 80°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen (2xSSC, 3 min; 1xSSC, 3 min; TBS, 2 min) bei Raumtemperatur und zehnminütiger Blockung mit Normal-Human-Serum (NHP) (10% in TBS) wurde die Sonde mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex (NEN, 1:500 in NHP 1:10 in TBS) 20 Minuten detektiert. Nach dreiminütigem Waschen mit TBS wurde mit AEC-Gebrauchslösung entwickelt. Als Positivkontrolle wurde markierter puC18 –Vektor auftragen.

### **3.12. Etablierung eines Protokolls für die in-situ Hybridisierung nach der TSA-Methode**

Der Nachweis von HPV-DNA im morphologischen Kontext nichtmelanozytärer Tumoren der Haut war unter Verwendung des Protokolls von Odenthal et al. (1993) nicht möglich. Daher wurde ein hochsensitives Protokoll für die in-situ Hybridisierung nach der von der Firma NEN entwickelten TSA™-Methode (tyramide signal amplification), die auch als CARD (catalyzed reporter deposition) bezeichnet wird, etabliert. Die optimalen Parameter der Konzentrationen und der Inkubationszeiten der Permeabilisierung des Materials mit Proteinase K, der Sonden, der Antikörper und von TSA wurden ausgetestet. Bei der TSA™-Methode handelt es sich um eine Enzym-vermittelte Detektionsmethode, die die katalytische Aktivität der Meerrettich-Peroxidase (HRP) nutzt, um eine starke Markierung in-situ zu erreichen. Peroxidase ist in der Lage, eine Vielzahl von Biotin-Tyramid-Radikalen zu erzeugen, die mit Molekülen (i.d.R. den Phenol-Resten von Tyrosin) in direkter Nähe unter Bildung kovalenter Bindungen reagieren. Durch die Kurzlebigkeit von Radikalen, kommt es

zu minimaler Diffusion und somit hoher Signalschärfe. Anschließend wird an das mit Biotin markierte gebundene Tyramid, ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex gebunden, der einen Farbnachweis mit z.B. AEC ermöglicht.

### 3.12.1. Protokoll der in-situ-Hybridisierung nach der TSA-Methode

Alle Inkubationen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Schnitte auftauen und mittels Diamantschneider umranden
- Schnitte in einer Plastikküvette in auf 100°C vortemperierten Na-Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) für 10 min in der Mikrowelle bei 900 Watt kochen, Puffer nach 5 min auffüllen
- Waschen mit PBS, 1 min
- Proteinase K (1 ug/ml in Tris 50 mM / EDTA 5 mM), für 10 min bei 37°C in der feuchten Kammer (FK)
- Stoppen mit Glycin (0,2% in PBS), 30 sec
- Nachfixieren mit Paraformaldehyd (PFA) (4%ig in PBS), 10 min
- zweimal waschen mit TBS, 1 min und einmal mit TBS (Glycin 50 mM), 5 min
- Blocken endogener Peroxidasen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1%ig in TBS), 30 min
- zweimal waschen mit TBS, 3 min
- Dehydrierung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe, je 1min (70% Ethanol, 90% Ethanol, 100% Ethanol)
- Schnitte lufttrocknen
- Prähybridisierungsmix 1 min denaturieren (99°C), auf die Schnitte geben (50-100 ul / Schnitt), 30 min, dekantieren
- Hybridisierungsmix (Sondenkonzentration 500ng/ml bei kompletten Genom, bei 400bp-Fragment 20ng/ml), 1 min denaturieren (99°C), auf die Schnitte auftragen (50-100 ul / Schnitt) und die Schnitte auf der Heizplatte bei 98°C inkubieren, 1 min
- Inkubieren über Nacht / 42°C
- Blocken mit Normal Human Plasma (NHP), 30 min, dekantieren,
- Streptavidin-Meerrettich-Komplex (NEN, 1:500 in NHP), 30 min
- zweimal waschen mit TBS, 3 min

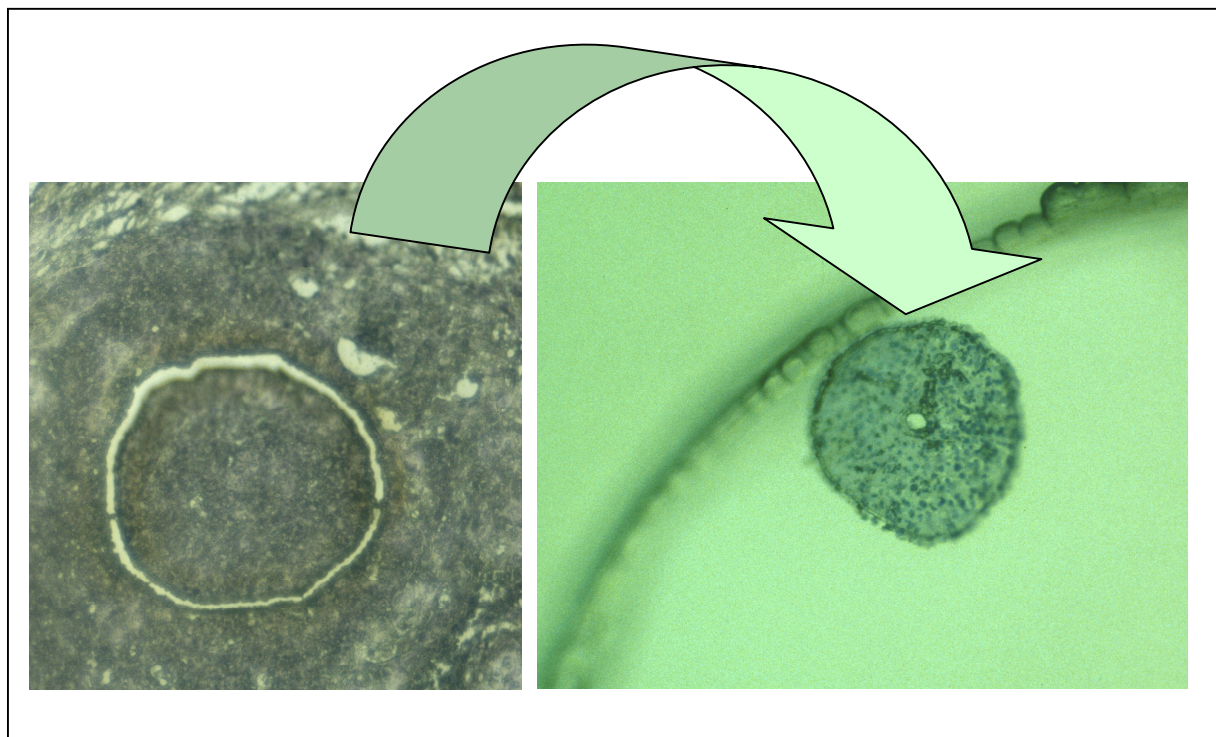
- Biotinylthramid-Gebrauchslösung (1:50 in Amplification Diluent), 20 min
- zweimal waschen mit TBS, 3 min
- Streptavidin-Meerrettich-Komplex (NEN, 1:500 in NHP), 30 min
- zweimal waschen mit TBS, 3 min
- Entwicklung mit DAB 50x (1:10) oder AEC für ca. 15 bis 60 min bei regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle
- Waschen mit dest. Wasser, 5 min
- Gegenfärben mit Hämatoxylin nach Mayer 1 min, dann eine Minute Bläuen in Leitungswasser
- Eindecken mit Glyceringelantine

### **3.13. Mikrodissektion**

Paraffineingebettete Gewebeproben bieten für molekularbiologische Untersuchungen durch ihre Lagerfähigkeit, unter optimaler Erhaltung der morphologischen Strukturen und der Möglichkeit der DNA-Extraktion, für retrospektive Untersuchungen umfangreiches Untersuchungsmaterial. Für Untersuchungen, die nicht in-situ stattfinden, sind die Möglichkeiten oft durch die zelluläre Heterogenität beschränkt. Zelltypische Eigenschaften der zu analysierenden Zellpopulation können durch Zellen des umgebenden Gewebes aus quantitativen Gründen überdeckt und somit verfälscht werden. Der Wunsch, mikroskopisch identifizierte, einzelne Zellelemente, Zellen oder Zellareale einer molekularbiologischen Untersuchung gezielt zugänglich zu machen, führte zur Entwicklung von leicht anwendbaren Methoden zur selektiven Isolierung von Einzelzellen bzw. Zellarealen aus Paraffin- und auch Frischschnitten.

In dieser Arbeit wurde die Mikrodissektion mit Hilfe des Robot-Mikrobeam Systems durchgeführt. Das System besteht aus einem pulsierenden, niedrig-Energie Stickstoff Laser (337nm), einem invertierten Mikroskop und einem motorisierten computergesteuerten Mikromanipulator (Objekttisch). Der Mikromanipulator bewegt den Schnitt relativ zu der Mikroskoplinse, durch die der Laserstrahl auf die Probe geführt wird. In minimalem Abstand über dem Schnitt wird ein Deckel eines Eppendorf-Gefäßes gehalten. Dieser enthält einen Tropfen (0,5 µl) TrisHCL-Puffer, in den die Probe hineinkatapultiert wird (Schutze et al., 1998). Für die Mikrodissektion wurden Hämalaun gefärbte Schnitte auf Folie verwendet. Die Mikrodissektion wurde unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt. Hierbei wurde mit einem 25-fach vergrößernden Objektiv mikroskopiert und disseziert. Der computergesteuerte Tisch

wurde mit Hilfe einer Computermouse bewegt. Für feine Schnittränder war eine niedrige Bewegungsgeschwindigkeit bei geringer Laserleistung und maximaler Pulsfrequenz optimal (Fokus: 0-2, Energie: 40-60). Leistung sowie Pulsfrequenz des Lasers konnten stufenlos gewählt werden, um einen individuellen, möglichst feinen Schnitt des Gewebes zu gewährleisten. Die Aktivierung des Lasers erfolgte durch einen Fußschalter. Zur optimalen Präparation waren eine möglichst niedrige Laserleistung und eine exakte Fokussierung der Zielebene erforderlich. Eine exakte Laserfokussierung verursacht nur äußerst geringe Schäden am Gewebe. Zum Katapultieren wurden folgende Einstellungen verwendet: Fokus: 0-2, Energie: 50-65. Das erfolgreiche Katapultieren der Gewebeprobe in die sich im Deckel befindliche Pufferlösung konnte ebenfalls mikroskopisch kontrolliert werden, indem man zum 10er Objektiv wechselte und die Probe im Deckel schwimmen sehen konnte (Abbildung 4). Die Proben standen nun zur DNA-Extraktion bereit (3.1.4).



**Abbildung 4:** Das linke Bild zeigt einen mikrodissezierten Tumorbereich eines Tonsillenkarcinoms. In der rechten Aufnahme ist der gleiche Bereich, aufgefangen im Eppendorfgefäßdeckel gezeigt.

### 3.14. Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen (deskriptive Statistik, Odds Ratio (OR), Fischer exakter Test, Mann-Whitney-U test etc.) wurden mit der Software SPSS 10.0.7 gerechnet. P-

Werte die kleiner als 5% und OR deren 95% Konfidenzintervall [CI] die 1 ausschlossen, wurden als statistisch signifikant gewertet. Es wurde nicht auf multiple Testung adjustiert. Zur Vermeidung statistischer Probleme durch wiederholte Messung eines Patienten, wurden Berechnungen der Odds Ratios, des exakten Tests nach Fischer und dem Mann-Whitney-U Test mit lediglich einer Probe pro Patient (erste positive Probe) durchgeführt.

## IV. ERGEBNISSE

### 4.1. Etablierung von Echt-Zeit-PCR-Protokollen zur Bestimmung von Virusspiegeln genitaler und kutaner HPV

Ziel des ersten Teils der Arbeit war das Design und die Etablierung robuster, sensitiver und typspezifischer Echt-Zeit-Fluoreszenz-PCR-Protokolle für die Quantifizierung von HPV-DNA. Dabei wurden die HPV-Typen der phylogenetischen Gruppe B1, aufgrund ihres häufigen Vorkommens in Läsionen der Psoriasis (HPV5, 20 und 36), bzw. wegen ihres Vorkommens in verfügbaren Biopsien von nicht-melanozytären Hauttumoren (HPV8), ausgewählt. Das Protokoll für HPV7 wurde zur Bestimmung der Viruslast in orofazialen Warzen, die als Vergleichsmaterial dienten, etabliert. Für die Analyse genitaler Abstriche und mikrodiseziierter Zervixkarzinomzellen, wurden für die häufigsten mukotropen hoch-Risiko HPV-Typen (HPV16, 18, 31, 33, 45 und 56; Gruppe A), die in mehr als 80% aller zervikalen Plattenepithelkarzinome weltweit nachgewiesen wurden, Protokolle entworfen (Bosch et al., 1995; Walboomers et al., 1999a). Aufgrund teils sehr kleiner Kopienzahlen viraler DNA und häufig vorliegender multipler Infektionen wurde im sensitiven Sondenhybridisierungsformat gearbeitet. Dabei wurden für jeden HPV-Typ sowohl individuelle Primer als auch individuelle Sonden entworfen, die eine sowohl sensitive als auch typspezifische Quantifizierung erlauben. Diese Primer/Sondenkombinationen wurden optimiert und evaluiert. Besonderer Wert wurde auf die Verlässlichkeit der Quantifizierung in Gegenwart koinfizierender HPV-Typen, die Reproduzierbarkeit der Messwerte bei wiederholter Quantifizierung, die Reproduzierbarkeit bei Patientenproben und die Robustheit der Protokolle bei kleinen Variationen der Konzentrationen von Magnesiumchlorid, der Primer und der dNTPs gelegt.

#### 4.1.1. Festlegung des zu amplifizierenden HPV-Genomabschnitts

Als PCR-Zielsequenz innerhalb des HPV-Genoms sollte das L1-Gen dienen. Gründe hierfür sind, daß HPV-Typen über ihre L1-Gen-Sequenzabweichungen definiert werden, daß das L1-Gen auch bei Integration in das menschliche Genom intakt bleibt, und daß von vielen vermutlich neuen HPV-Typen bisher nur L1-Gen-Sequenzen vorliegen. Mit Hilfe eines computergestützten Sequenzvergleiches (Mac

Vector 6.5) wurden L1-Gen-Bereiche, welche bei allen humanen Papillomviren der Gruppe A und B1 gut konserviert sind, für die verschiedenen PCRs ausgewählt.

#### 4.1.2. Auswahl geeigneter Primersequenzen für die einfach- und nested PCR

Oligonukleotide müssen einige prinzipielle Voraussetzungen erfüllen, um als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion in Frage zu kommen (Saiki et al., 1989) (Innis et al., 1990):

1. Es ist wichtig, daß die ausgewählten Primerpaare einen annähernd gleichen Schmelzpunkt haben. Dadurch besitzen die Primer ähnliche oder sogar gleiche Annealingeigenschaften. Optimale Schmelzpunkte liegen dabei im Bereich von 60°C, da so hohe Annealingtemperaturen benutzt werden können, die eine spezifische Amplifikation der Zielsequenz ermöglichen.
2. Das Auftreten von Sekundärstrukturen wie z.B. „hairpins“ sollte vermieden werden.
3. Zwischen den beiden Primern eines Paares, insbesondere im 3'-Bereich, sollte keine Komplementarität bestehen, da diese zur gegenseitigen Anlagerung (Dimerbildung) führen kann. Die Dimerbildung beeinträchtigt wiederum die Effizienz der Amplifikation der eigentlichen Zielsequenz. Die neuen Primer wurden u. a. nach den oben genannten Kriterien ausgewählt und sollten eine Länge von 18 nt bis 24 nt aufweisen. Die Schmelzpunktberechnung ( $T_m$ ) erfolgte nach einer Formel von Suggs et al., 1981.

$$T_m = 2x \sum(A/T) + 4x \sum(G/C) \text{ in } ^\circ\text{C}$$

Der G/C-Gehalt eines Primers sollte idealerweise zwischen 45 und 60% liegen und beide Primer sollten jeweils einen ähnlichen G/C-Gehalt aufweisen.

Es wurden insgesamt 47 Primer ausgewählt.

##### 4.1.2.1. Primer für den PCR-Nachweis HPV-spezifischer Sequenzen

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 9 angegeben. Die Namen, der für quantitative Bestimmungen verwendeten Primer, beginnen mit LC.



Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Bindestelle im HPV-Genom*
LC5L1fw	GGCTGGAGCACTAAAAGATG	Pos. 6999-7018
LC5L1bw	GGATTCTTATCTGGACACCG	Pos. 7243-7262
LC7L1fw	GCCCAGGGTCATAACAATGG	Pos. 6737-6756
LC7L1bw	AAGGTTGCAGACGCTGGAGG	Pos. 7035-7016
LC8L1fw	GTTTACACTGAAAATGGGGAAC	Pos. 6919-6940
LC8L1bw	AAACTTTGCATATGGATCAGGCT	Pos. 7227-7205
LC16L1fw	GCACAGGGCCACAATAAT	Pos. 6584-6601
LC16L1bw	GACCAAAATTCCAGTCCTC	Pos. 6854-6836
LC18L1fw	GCACAGGGTCATAACAATGG	Pos. 6558-6577
LC18L1bw	CAAAGTTCCAATCCTCTAA	Pos. 6810-6828
LC31L1fw	GCTCAGGGACACAATAATGG	Pos. 6510-6515
LC31L1bw	CAAATTCCAATCTTCC AAA	Pos. 6748-6767
LC33L1fw	GCACAAGGTCATAATAATGG	Pos. 6539-6558
LC33L1bw	CAAATTGCCAATCTTCTAA	Pos. 6785-6803
LC36L1fw	CAATAATGGGGCACTAAAGGAC	Pos. 6970-6991
LC36L1bw	TCAGGACAGCGAGTGGCTAAT	Pos. 7227-7207
LC45L1fw	GCCCAGGGCCATAACAATGG	Pos. 6562-6581
LC45L1bw	CAAATTCCAATTTTCTAA	Pos. 6814-6832
LC56L1fw	GCCCAAGGCCATAATAATGG	Pos. 6539-6558
LC56L1bw	CAATATTCCAGTCCTCCAG	Pos. 6785-6803
HPV9fw-ex2	CAGAGCAGATTATGGACAGGC	Pos. 210-230
HPV9bw-ex2	CATTCTACCGACCCACAGTG	Pos. 645-626
HPV9fw-int1	GCAGACACTCTTGTGATTCC	Pos. 257-276
HPV9bw-int1	AAACAGTAGCGACACCTAATAC	Pos. 534-513
HPV24fw-int3	CGATTTTGTGTTTGCATGTTGTAGA	Pos. 362-385
HPV24bw-int3	CAGAGATATCAAGCTTTTCAATTTG	Pos. 548-527
HPV24fw-ex2	GGCTCAACCAGGTAAACCTCAGTCA	Pos. 202-226
HPV24bw-ex2	TCTGCTTACACTGCCTACAGAGTCC	Pos. 617-593
HPV38fw-ex	GGAAC TACCAAAACCTCAAAC TGTG	Pos. 202-226
HPV38bw-ex2	TTGCCTCTAACCTTGTGAAATGC	Pos. 585-563

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Bindestelle im HPV-Genom*
HPV38fw-int1	GGACTCAAGAGGATTTTGT TTTTGC	Pos. 351-375
HPV38bw-int1	TCTGTTGCTCCACCTGTTC	Pos. 476-459

**Tabelle 9:** Primer für den PCR-Nachweis HPV-spezifischer Sequenzen

\*Die Positionsangaben im HPV-Genom folgen den in der Literatur angegebenen Numerierungen der verwendeten Plasmide (2.4.2.).

#### 4.1.3. Auswahl geeigneter Sondensequenzen für die Echt-Zeit-PCR

Im Allgemeinen gelten für den Entwurf von Hybridisierungs sonden die gleichen Regeln wie für Primer. Davon abweichende Regeln und Ergänzungen sollen in dem folgenden Abschnitt erläutert werden. Für die Quantifizierung ist es wichtig, ein starkes Signal zu generieren. Die Konkurrenzsituation zwischen den Sonden und den Primern legt nahe, daß ihre Schmelztemperatur höher sein sollte. Ein Abstand von 5-10°C, allerdings innerhalb der folgenden Grenzen, wird empfohlen (TIB MolBiol): Die Schmelztemperatur darf nicht zu hoch sein, damit die Sonden noch von dem wachsenden Strang verdrängt werden können. Andernfalls wird die Amplifikation behindert und die PCR ist inhibiert. Als grober Richtwert gelten 5°C oberhalb der Extensionstemperatur, beziehungsweise 5-10°C über der Primer-annealingtemperatur. Die Schmelztemperatur muß oberhalb der Annealingtemperatur liegen, damit die Sonden tatsächlich binden können. Für sehr kurze und bindungsschwache Primer kann die Schmelztemperatur der Sonden daher durchaus um mehr als 10°C erhöht sein. Alternativ lassen sich auch die Primer anpassen, um die oben beschriebenen Verhältnisse zu schaffen. Wenn man einen Primer an seinem 5'-Ende verändert, wird man seine Spezifität im Allgemeinen nicht ändern und wird sich eine aufwändige neue Evaluierung eines bestehenden Systems wahrscheinlich ersparen können. Wenn am 5'-Ende keine weiteren Basen bekannt sind, um einen Primer zu verlängern, kann man beliebige Basen anhängen, so daß die Primer nach einem einmalig erfolgreichen Zyklus die entsprechend verlängerte Zielsequenz vorfinden werden. Prinzipiell können die Hybridisierungs sonden irgendwo auf der Zielsequenz binden. Aufgrund der Konkurrenzsituation oder einer Kompetition mit den Primern und dem wachsenden Strang, sollten Sonden vorzugsweise entfernt von den Primern positioniert werden. Die Sonden binden

naturgemäß auch an anderen, nah verwandten Stellen. Die Konsequenz der Bindung einer Sonde an anderen Stellen ist kein falsches Signal, sondern die Reduzierung ihrer 'freien' Konzentration und schwächt somit das Fluoreszenzsignal. Dieser Effekt ist erst in den späten Zyklen von Bedeutung wenn große Mengen der Zielsequenz amplifiziert worden sind. Im Gegensatz zum Design von Primern sind daher komplementäre Bereiche außerhalb der amplifizierten Sequenz ohne Relevanz. Strukturelle Besonderheiten beeinflussen das Bindungsverhalten von Nukleinsäuren. Daher sollten Sequenzen verwendet werden, die eine ungefähre Gleichverteilung der vier Basen aufweisen. Ungewöhnlich fest bindende Sequenzabschnitte innerhalb einer Sonde (GC-reiche Sequenzen) sollten vermieden werden, da für gewöhnlich ganz kurze Abschnitte für die Bindung verantwortlich sind und es somit statistisch auch mehr verwandte, falsche Bindungsorte für diese Sequenz geben wird. Repetitive und monotone Sequenzen geben keinen definierten Bindungsort und führen zu einer Verteilung der Sonde über verschiedene Positionen. Eine sehr wichtige Regel ist, Komplementaritäten zwischen dem 3'-Ende des Primers und den Sonden zu vermeiden. Schon relativ kurze Sequenzabschnitte führen insbesondere zu Beginn der PCR, wenn noch kein Fragment amplifiziert ist, dazu, daß Primer-Sonden-Dimere gebildet werden, die zu unspezifischen Produkten führen und eventuell sogar falsche Fluoreszenzsignale erzeugen können.

Die Hybridisierungssonden für den LightCycler binden benachbart, so daß sich die terminalen Fluorophore gegenüberstehen. Ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) findet nur statt, wenn beide Sonden dicht benachbart binden. Man verwendet benachbarte Sequenzen auf demselben Strang, mit einer Lücke von 1-5 Basen. Die 3'-Enden müssen blockiert sein, üblicherweise als 3'-Phosphat und als 3'-Fluorescein, damit sie nicht als Primer arbeiten können.

#### **4.1.3.1 Oligonukleotidsonden für die Quantifizierung im LightCycler**

Die Sequenzen der verwendeten Sonden sind in Tabelle 10 angegeben. An das 5'-Ende der 3'-Sonde wurde Fluorescein (fl), an das 3'-Ende der 5'-Sonde LightCycler Red640 oder LightCycler Red 705 (R640/R705) gekoppelt. Die 5'-Sonden wurden, um eine Verlängerung durch die Polymerase auszuschließen, phosphoryliert (-ph).

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'
So5-1	GATATTTTCATATTCTTCTACATGTCTTTGATA-fl
So5-2	R640-TCTCTAAATTGATCTGCATTATAGTCTGCAA-ph
So8-1	ATTGTGTAAGATAACCACTAAAGGCTGATGT-fl
So8-2	R640-TTAGCACAAATCAATGCCATGAATTCA-ph
So16-1	TCAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGC-fl
So16-2	R-640-ACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCCACT-ph
So18-1	TTGGTAGCATCATATTGCCAGGTACA-fl
So18-2	R640-AGACTGTGTAGAAGCACATATTGTTAAATTGG-ph
So31-1	AATTACTACTTTTAAATGTAGTATCACTGT-fl
So31-2	R640-TGCAATTGCAGCACAAACAGACATATTG-ph
So33-1	ATATGTACTGTCAGTACTTGTGTGCAT-fl
So33-2	R640-AGTCATATTAGTACTGCGAGTGGTATCT-ph
So36-1	TAATATTACAGCTATGTAAGGTTCTCTGAA-fl
So36-2	R640-CAGAAGTATTGGCTCAGATAAATGCTATG-ph
So45-1	AACTTAGTAGGGTCATATGTACTTGGC-fl
So45-2	R640-CAGGATTTTGTGTAGAGGCACATAATG-ph
So56-1	GCATCATATTTACTTAACTGTTCTGTAGC-fl
So56-2	R640 - GTACTAATAGTCATGTTAGTACTTCTAGTAGTATC-ph

**Tabelle 10:** Sonden für die Quantifizierung HPV-spezifischer Sequenzen.

#### 4.1.4. PCR-Reaktionsbedingungen

Denaturierungszeiten und -temperaturen:

Die optimalen Denaturierungstemperaturen liegen zwischen 90-95°C und führen zu einer Auftrennung der Doppelstrang-DNA. Die Denaturierungszeiten sollten so gewählt werden, daß einerseits eine vollständige Trennung der Doppelstrang-DNA erfolgen kann, daß aber andererseits die Lebensdauer der Taq Polymerase nicht zu stark verkürzt wird. Für den LightCycler hat sich ein initialer Denaturierungsschritt von 60s und eine Denaturierungszeit von 1s als ausreichend erwiesen.

#### Annealingzeiten und -temperatur:

Die Annealingzeit sollte lang genug sein, um ein komplettes Annealing zu gewährleisten, jedoch nicht zu lang, um das Auftreten von unspezifischem Primer-Annealing möglichst gering halten zu können, bzw. zu vermeiden. Bei den neu etablierten PCRs wurden Annealingzeiten von 10 Sekunden als ausreichend lang getestet. Bezüglich der optimalen Annealingtemperatur, wurden für jede Primerkombination verschiedene Temperaturen getestet. Die Annealingtemperatur wurde entsprechend der Länge und dem G/C-Gehalt der Primer gewählt. Sie errechnete sich theoretisch, indem man von der Schmelztemperatur der Primer mindestens 5°C subtrahiert. Allgemein gilt, daß die Spezifität mit höherer Annealingtemperatur steigt.

#### Synthesezeiten und -temperaturen:

Die Synthesetemperatur der PCR liegt generell bei 72°C, da diese Temperatur optimal für die Taq Polymerase ist (Saiki et al., 1989). In ca. 1 Minute kann ein Amplimer von 2 kb hergestellt werden. Entsprechend der Länge der Zielsequenz wurden die Zeiten ausgewählt. Die Temperaturangleichungszeit entfällt durch das optimierte Verhältnis von Oberfläche und Volumen der beim LightCycler verwendeten Kapillaren weitgehend. Die optimalen Synthesezeiten und Synthesetemperaturen der Platinum Taq Polymerase lagen bei 72°C für 8 Sekunden.

#### Magnesium-Konzentration:

Die  $Mg^{2+}$ -Konzentration nimmt Einfluß auf das Primerannealing, auf die Template-Denaturierung und die Polymerase-Aktivität (Saiki et al., 1989; Innis et al., 1990). Zu hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen führten zum Auftreten von unspezifischen Produkten und zur Inhibition der Taq Polymerase-Aktivität. Allerdings sind bestimmte Mengen an freiem Magnesium für die Funktion der Taq Polymerase wichtig. Getestet wurden initial drei verschiedene  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen (Endkonzentrationen je 2,5 mM; 3,5 mM; und 4,5 mM). Anschließend wurde in 0.25mM Endkonzentrationsschritten, +/- 0,5mM um den besten Wert (niedrigster Schwellenzyklus), die optimale  $Mg^{2+}$ -Konzentration der jeweiligen Primer-Sondenkombination ermittelt.

#### Primerkonzentration:

Ausreichend hohe Primerkonzentrationen sind für das Erzielen einer guten Sensitivität wichtig, während zu hohe Konzentrationen das Auftreten von Dimeren und unspezifischen PCR-Produkten begünstigen. Wir haben jeweils Primerendkonzentrationen von 0,15  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$  und 0,35  $\mu\text{M}$  getestet. Hierbei zeigte sich, daß Primerendkonzentrationen von 0,25  $\mu\text{M}$  optimal waren.

#### Zykluszahl:

Die Zykluszahl sollte so gewählt werden, daß eine ausreichende Amplifikation der Zielsequenzen möglich ist, um diese anschließend mit Hilfe der LightCycler-Software analysieren zu können. Es wurden 45 Zyklen als ausreichend ermittelt.

#### **4.1.5. Neu etablierte Echt-Zeit-PCR-Protokolle zur Bestimmung von Virusspiegeln genitaler und kutaner HPVs**

Die quantitativen PCRs wurden, wie in 3.8.2. angegeben, durchgeführt. Die ermittelten individuellen Annealingtemperaturen ( $T_{\text{ann.}}$ ), Magnesiumchloridkonzentrationen und Abweichungen vom Standard sind in Tabelle 11 angegeben.

#### **4.1.6. Erreichte Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit der neu etablierten Echt-Zeit-PCR Protokolle**

Die Sensitivität der einzelnen Protokolle wurde unter Verwendung von zwei unabhängigen zehnfach-Verdünnungsreihen mit mindestens drei Wiederholungen pro Verdünnungsstufe ermittelt und lag bei allen Protokollen bei mindestens zehn Kopien.

Die Spezifität des Protokolls für den jeweiligen Zieltyp wurde durch den Einsatz von  $5 \times 10^5$  Kopien häufiger HPV-Typen (z.B. für HPV18: HPV6, 11, 16, 31, 33, 45 u. 56) getestet und lieferte in keinem der etablierten Protokolle Signale über dem Hintergrund.

HPV-Typ	T <sub>ann.</sub> [°C]	Mg <sup>2+</sup> [mM]	Besonderheiten
5			
7 <sup>1</sup>	65	3,0	<sup>2</sup> 5s; <sup>3</sup> 8s; <sup>4</sup> 2°C/s
8	56	5,5	
16	56	4,25	
18	55	3,5	
20	47	3,0	<sup>5</sup> 97°C; <sup>3</sup> 13s; <sup>4</sup> 2°C/s
31	55	4,5	
33	54	3,0	
36	61	4,0	<sup>3</sup> 15s; <sup>4</sup> 2°C/s; Primer 36fw wurde 0,25µM, Primer 36bw 0,375µM eingesetzt
45	54	4,5	
56	54	4,0	

**Tabelle 11:** Annealingtemperaturen (T<sub>ann.</sub>) ,Magnesiumchloridkonzentrationen und Besonderheiten individueller Primer für die Echt-Zeit-PCR.

<sup>1</sup> Die PCR wurde mit dem Fluorophor Sybr Green durchgeführt

<sup>2</sup> Annealingdauer

<sup>3</sup> Elongationszeit

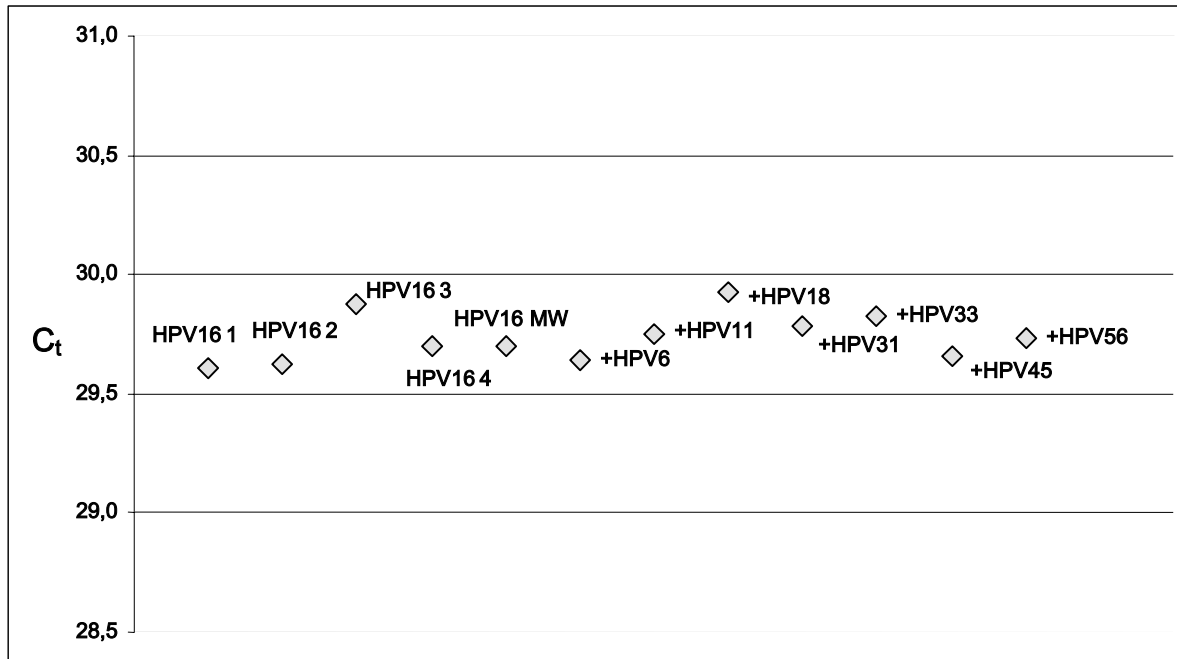
<sup>4</sup> Temperaturgradient von der Annealing- zur Elongationstemperatur

<sup>5</sup> Denaturierungstemperatur im Amplifikationsteil

Der quantifizierbare Bereich erstreckte sich für alle Typen von 10 bis 10<sup>9</sup> Kopien.

Die Verlässlichkeit der Quantifizierung des jeweiligen HPV-Typs in Gegenwart anderer HPV-Typen, wurde durch den Zusatz (spiken) von 100.000 Kopien nahverwandter und häufiger HPV-Typen zu je drei identischen Proben mit 1000 Kopien des Zieltyps getestet. Das Protokoll wurde als verlässlich gewertet, wenn die erhaltenen Schwellenzyklen (C<sub>t</sub>) der Kontrollproben innerhalb des Mittelwertes der ungespikten Proben, plus der dreifachen Standardabweichung lagen. Für HPV16 z.B., wurde aus vier ungespikten Proben mit 1000 Kopien ein Mittelwert des Schwellenzyklus von 29,7 mit einer Standardabweichung von 0,13 ermittelt.

Dementsprechend war der zulässige Bereich des Schwellenwerts bei gespickten Proben 29,09 - 30,19. Für die gespickten Proben wurden Werte zwischen 29,64 und 29,93 ermittelt (Abb. 5). Dieses Kriterium wurde entsprechend auch von den Protokollen der anderen oben genannten HPV-Typen erfüllt.



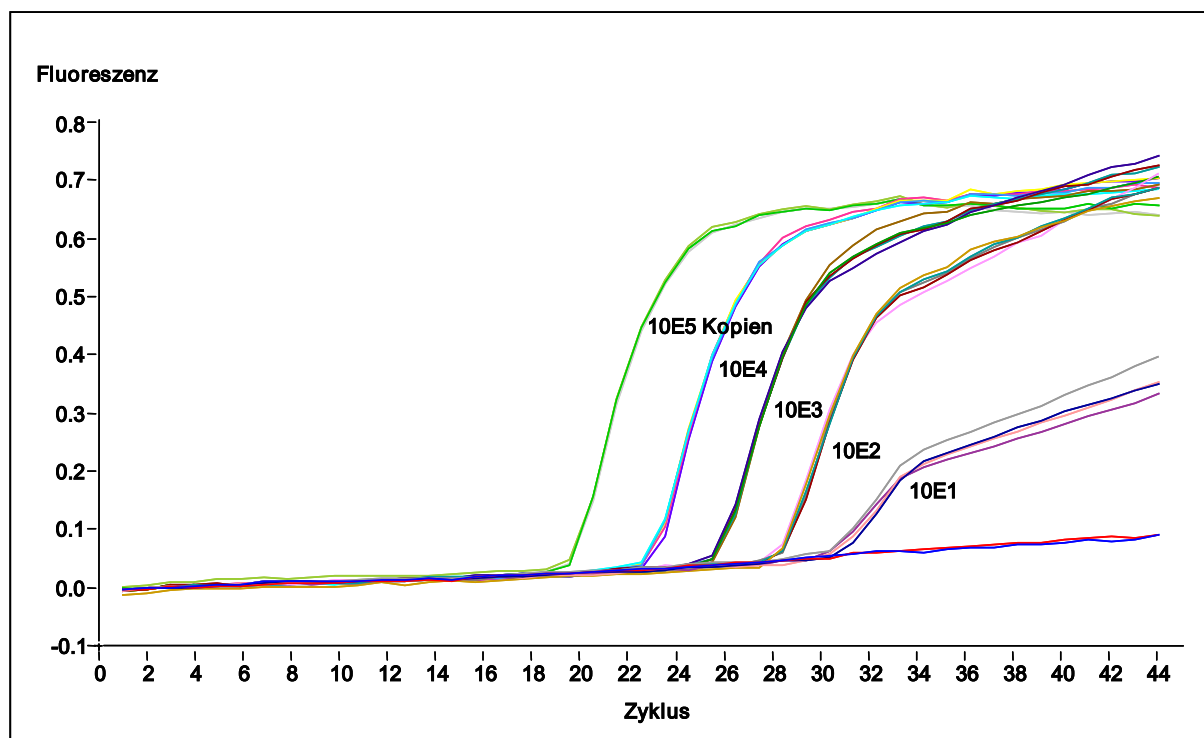
**Abb. 5:** Schwellenzyklus ( $C_t$ ) der Quantifizierung von 1000 HPV16-Kopien ohne Zugabe (HPV16 1-4, Mittelwert der Proben 16 1-16 4 (MW)) und mit Zugabe 100.000 Kopien anderer HPV-Typen (Mittelwert).

Um die Reproduzierbarkeit der einzelnen Protokolle zu bestimmen, wurden je fünf Replikate der Verdünnungsstufen  $10^1$ - $10^5$  gemessen. In Abbildung 6 sind, exemplarisch für HPV16, die Graphen der Fluoreszenzwerte gegen die Zykluszahl dargestellt. Dabei zeigen die Graphen der Replikate eine sehr hohe Übereinstimmung. Dies gilt besonders für die Zyklen, in denen sich das Signal erstmals von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet. Ihnen kommt ein besonderer Stellenwert zu, da diese für die Bestimmung des Schwellenzyklus ( $C_t$ ) verwendet werden. Dies wird durch die geringen Standardabweichungen des Schwellenzyklus und der daraus kalkultierten Kopienzahl der jeweiligen Verdünnungsstufen (Tabelle 12), bestätigt.



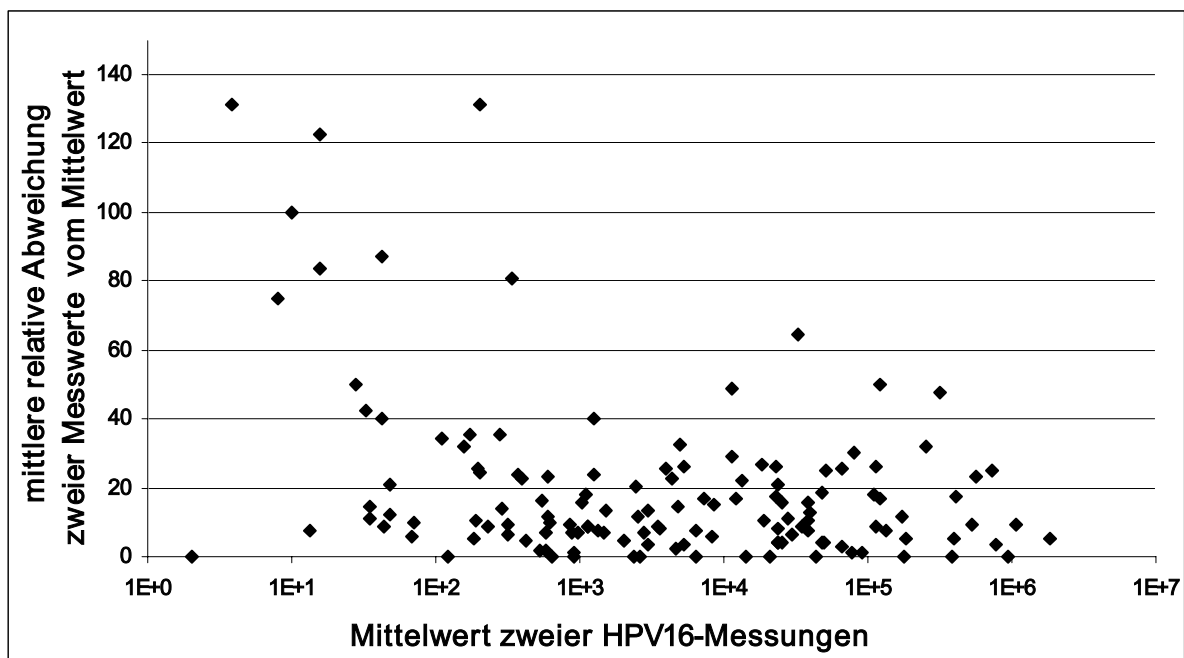
Eingesetzte Kopienzahl	Standardabweichung	
	$C_t$	berechnete Kopienzahl
$10^1$	0,581	10,08
$10^2$	0,114	7,39
$10^3$	0,056	38,23
$10^4$	0,053	412
$10^5$	0,015	1945

**Tabelle 12:** Standardabweichung des Schwellenzyklus ( $C_t$ ) und der kalkulierten Kopienzahl der jeweiligen Verdünnungsstufen für HPV16.



**Abb. 6:** Reproduzierbarkeit der HPV16-Echtzeit PCR. Es wurden zwei Negativkontrollen ( $H_2O$ ) und je fünf Replikate der Verdünnungsstufen  $10^1$ - $10^5$  eingesetzt.

Die Analyse wiederholter Messungen durch Korrelationskoeffizienten führt häufig zu falschen Einschätzungen der Übereinstimmung. Die Nullhypothese ist hierbei, daß die Ergebnisse zweier Messungen nicht linear verbunden sind. Die Wahrscheinlichkeit hierfür ist bei der Bestimmung zweier Werte mit derselben Methode sehr klein. Dies bedeutet aber nicht, daß die Werte übereinstimmen, sondern lediglich, daß sie entlang irgendeiner Gerade liegen. Weiterhin sind Korrelationskoeffizienten bei einer Verteilung der Messwerte über einen breiten Wertebereich nur sehr bedingt einsetzbar. Daher wurde zur Testung der Reproduzierbarkeit der HPV-DNA-Lasten bei der Verwendung von Patientenproben, für HPV16 als Modelltyp, der Betrag der relativen prozentualen Abweichung von wiederholten Messungen (relative prozentuale Abweichung=(Differenz der Kopienzahl zweier Messungen/ Mittelwert zweier Messungen)x100) errechnet und gegen den Mittelwert der Messungen aufgetragen (Abb. 7) (Bland et al., 1986). Der Mittelwert der relativen prozentualen Abweichung lag bei 18.9%, mit einer Standardabweichung von 25.4%. Abweichungen von mehr als 100% waren selten, hauptsächlich im Bereich kleiner Kopienzahlen (<100), zu beobachten und sind als stochastischer Effekt interpretierbar.



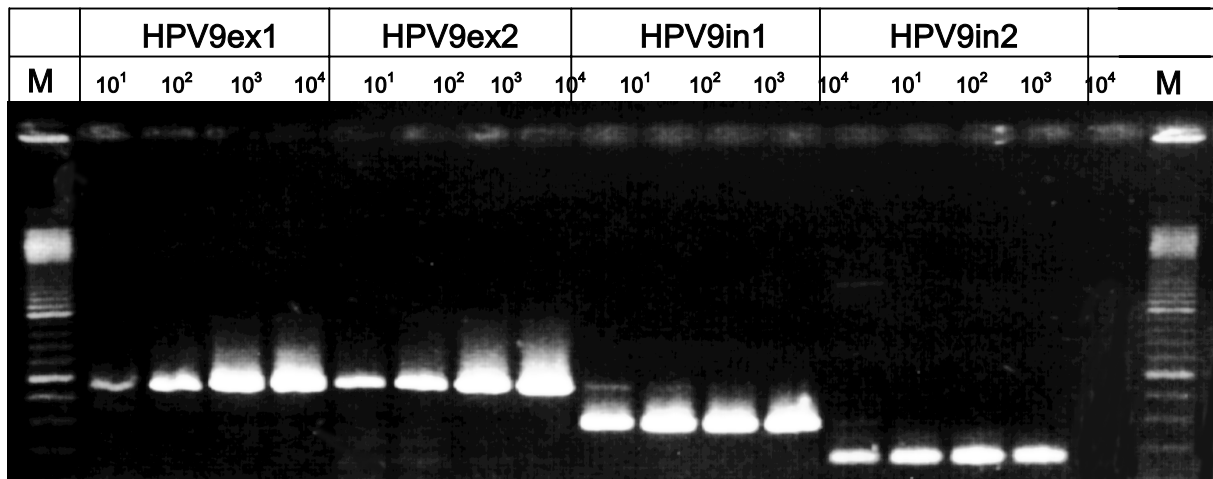
**Abb. 7:** Der Betrag der relativen prozentualen Abweichung von wiederholten HPV16-Last-Bestimmungen bei Patientenproben wurde gegen den Mittelwert zweier Messungen aufgetragen (relative prozentuale Abweichung=(Differenz der Kopienzahl zweier Messungen/Mittelwert zweier Messungen)x100).

Die Tag-zu-Tag und Anwender-zu-Anwender Tests zeigten eine exzellente Reproduzierbarkeit im Sinne des obigen Kriteriums. Die Robustheit der Protokolle wurde durch kleine Variationen ( $\pm 10\%$ ) der Konzentrationen von Magnesiumchlorid, der Primer und der dNTPs getestet. Die Testergebnisse wurden durch kleine Konzentrationsvariationen nicht beeinflusst.

#### **4.2. Etablierung von nested-PCR-Protokollen zum Nachweis von mRNA des Onkogens E6 von HPV9, 24 und 38**

HPV-DNA der kutanen HPV-Typen ist in den meisten Fälle erst durch Verwendung hochsensitiver PCR-Protokolle nachweisbar. Es war daher damit zu rechnen, daß auch mRNA des Onkogens E6 von HPV9, 24 und 38 nur in geringen Mengen vorliegen würde. Um maximale Sensitivität zu erreichen wurden Primerpaare für nested-PCR-Protokolle entworfen, die eine selektive Amplifikation der transkribierten RNA erlauben. Für eine Amplifikation mit maximaler Sensitivität und hoher Spezifität wurde der erste Zyklus mit einer Annealingtemperatur begonnen, die um  $15^{\circ}\text{C}$  höher als die berechnete Annealingtemperatur lag. In den folgenden vierzehn Zyklen wurde die Annealingtemperatur schrittweise um  $1^{\circ}\text{C}$  pro Zyklus abgesenkt. Anschließend wurden weitere 30 Zyklen bei dieser Temperatur durchgeführt (touch-down-PCR, Don et al., 1991).

Die Einzelschritte der nested-PCR-Protokolle wiesen eine Sensitivität von mindestens 50 Kopien HPV-DNA/Ansatz auf. Die Kombination der Einzelschritte zu nested-PCRs steigerte die Sensitivität der Protokolle auf  $<10$  Kopien HPV-DNA/Ansatz. In Abbildung 8 sind exemplarisch die Ergebnisse der HPV9-PCR angegeben. Hier wurden bereits mit den Einzelschritten der nested-PCR-Protokolle Sensitivitäten von mindestens 10 Kopien HPV-DNA/Ansatz erreicht. Die Primerkombination HPV9ex2/HPV9in1 wurde für die Analyse nichtmelanozytärer Hautumoren und unauffälliger Haut ausgewählt. Die Protokolle der neu etablierten nested-PCRs zum Nachweis von mRNA des Onkogens E6 von HPV9, 24 und 38 sind in 3.8.1.1. angegeben.



**Abb 8:** Nachweis von HPV9-DNA mit externen (HPV9ex1 u. 2) und internen (HPV9in1 u. 2) Primern in aufsteigenden Plasmidkonzentrationen ( $10^1$  -  $10^4$  Kopien; M: 100 bp Längenmarker).

### 4.3. Untersuchung von Patientenproben

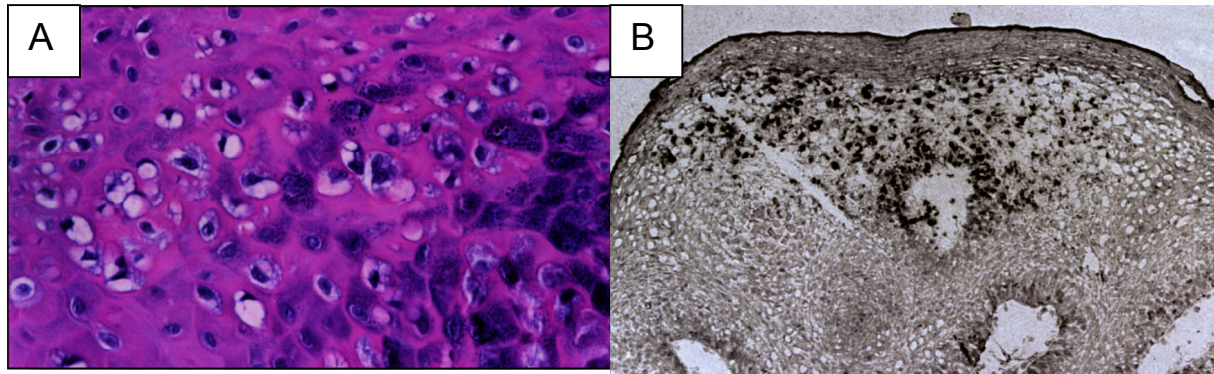
#### 4.3.1. Untersuchung nicht-melanozytärer Hauttumoren

##### 4.3.1.1. In-situ-Hybridisierung von HPV-DNA in nicht-melanozytären Hauttumoren

Um die Lokalisation von HPV-DNA in epithelialen Tumoren der Haut und normaler Haut zu bestimmen, wurde eine in-situ-Hybridisierung durchgeführt. Insgesamt wurden Schnitte von dreizehn Biopsien untersucht. Dabei handelte es sich um Tumoren von drei Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), bei denen die EV-HPV-Typen 15, 23 und RTRX5 nachgewiesen wurden, drei Patienten mit aktinischer Keratose (HPV20, 37, X14b), einen Patienten mit Morbus Bowen (RTRX9) und eine HPV7-positive periorale Warze. Von fünf der Tumorpatienten lagen Kontrollbiopsien normaler Haut, die mit dem gleichen HPV-Typ infiziert sind, vor. Als Positivkontrolle wurden Kryoschnitte eines HPV6-positiven Kondyloms eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde der Versuch ohne Sonde durchgeführt.

Unter Verwendung eines Protokolls von Odenthal et al. (1993) war es möglich, in Kryoschnitten einer perioralen Warze in den Kernen vakuolisierter Zellen des Stratum granulosum HPV7-DNA nachzuweisen (Abb. 9). In Kryoschnitten von Tumoren der Haut konnte mit diesem Protokoll in keinem Fall HPV-DNA der kutanen Typen nachgewiesen werden. Daher wurde bei diesen Tumoren und normaler Haut die in 3.12.1. beschriebene, hochsensitive TSA-Methode angewandt. Damit war es möglich

in Schnitten von zwei Plattenepithelkarzinomen, einer aktinischen Keratose und bei Morbus Bowen einzelne HPV-positive Zellen im Stratum spinosum, bzw. parakeratotischen Bereichen, nachzuweisen (Abbildung 9). HPV-DNA war hingegen in keiner der untersuchten Proben normaler Haut nachweisbar.



**Abbildung 9:** Haematoxylin-Eosin Schnitt (A) einer HPV7 positiven Warze mit koilozytären Zellen. In-situ-Hybridisierung von HPV7-DNA mit Digoxigenin-markierten Sonden. HPV7-DNA ist in vakuolisierten Zellen nachweisbar.

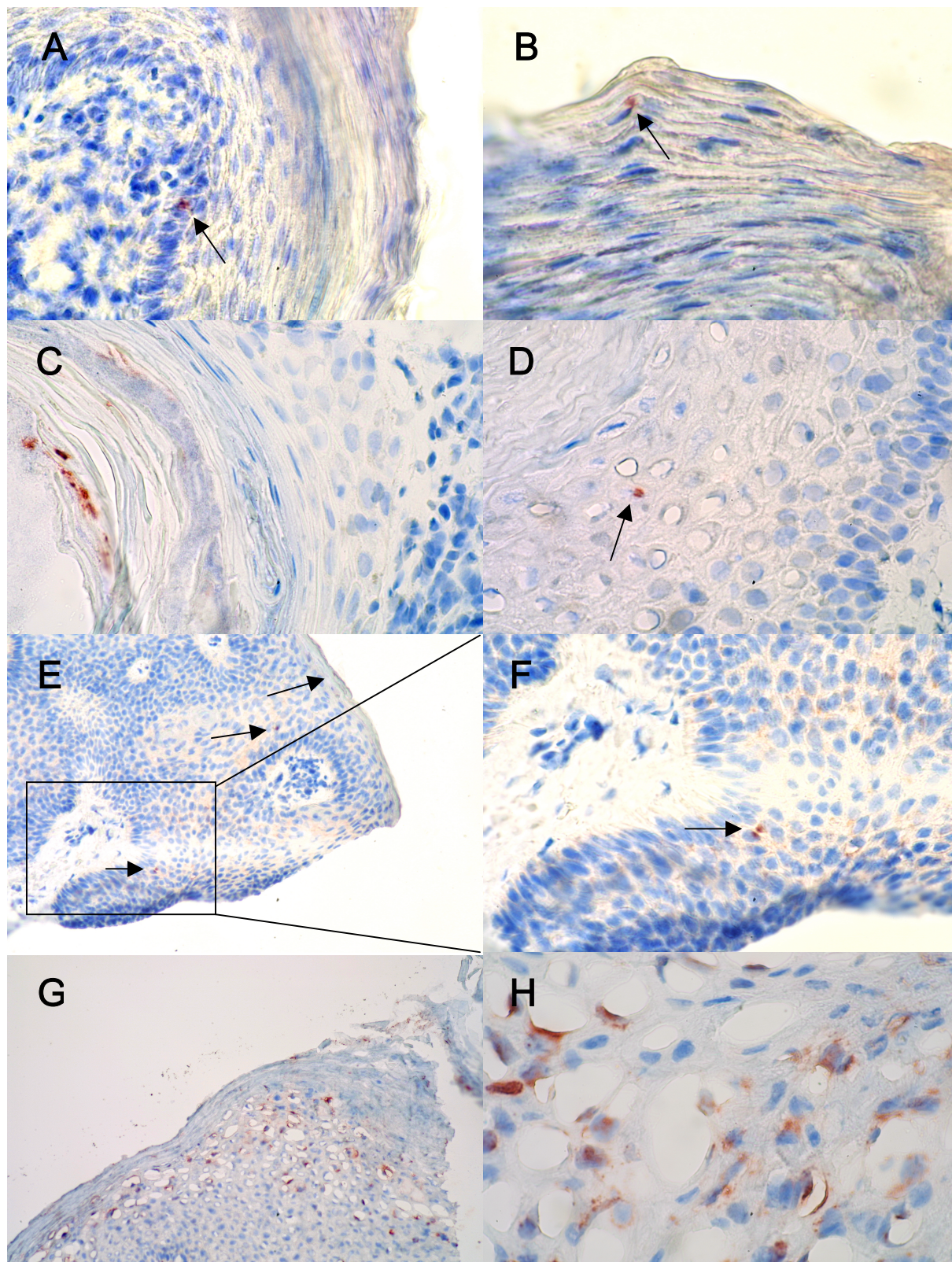
#### 4.3.1.2. Untersuchung von Probenpaaren gesunder Haut und Basaliomen, bzw. Plattenepithelkarzinomen auf E6-Onkogen-mRNA

##### 4.3.1.2.1. Aufarbeitung der Patientengewebe und Überprüfung der Qualität der RNA-Isolation

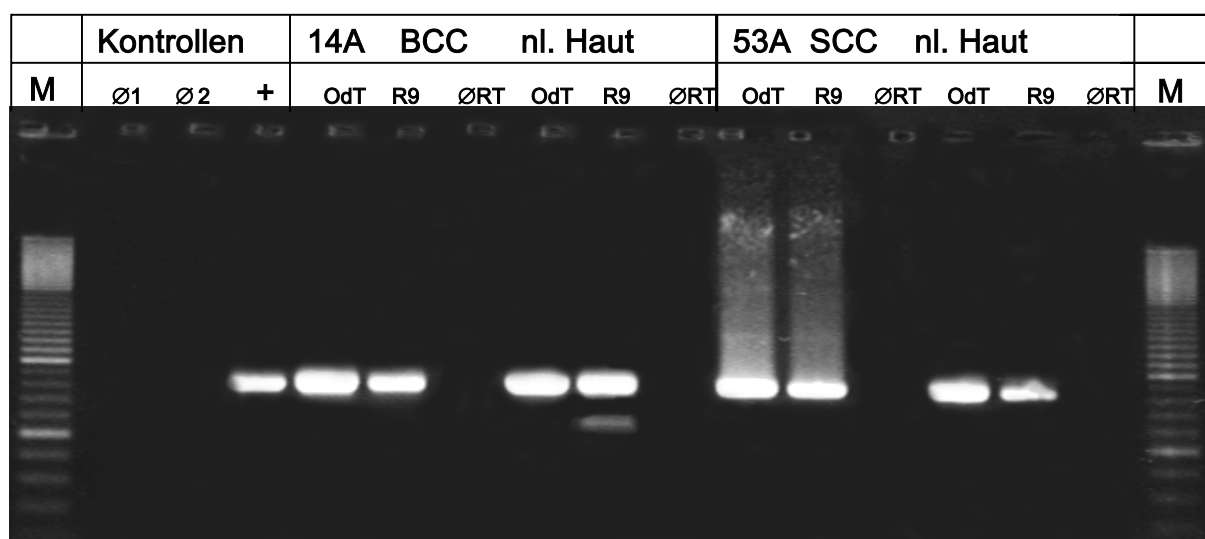
Zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von HPV in nichtmelanozytären Tumoren der Haut lag je ein Probenpaar eines Patienten, bestehend aus einem Basaliom bzw. einem Plattenepithelkarzinom und gesunder Haut, vor.

Zum Nachweis einer erfolgreichen Extraktion und reversen Transkription von RNA wurde das ubiquitär exprimierte Gen  $\beta$ -Aktin durch PCR nachgewiesen. Für die reverse Transkription, sowohl mit Oligo-dT-Primern (OdT), als auch mit Zufallsnonameren (R9), konnten für alle Tumoren  $\beta$ -Aktin-Sequenzen (838bp) nachgewiesen werden (Abb. 10). Die Negativkontrollen der reversen Transkription (Wasser statt Template) waren negativ. Ohne reverse Transkription konnten keine  $\beta$ -Aktin-Sequenzen in den RNA-Extrakten nachgewiesen werden.





**Abbildung 11:** Nachweis von HPV-DNA in Kryoschnitten von nichtmelanozytären Hauttumoren mittels in-situ-Hybridisierung mit biotinylierten Sonden nach der TSA-Methode. (SCC: Pat. 47, RTRX5, A und B; Pat. 116, HPV15 C und D; Morbus Bowen: Pat. 56, RTRX9 E und F; Positivkontrolle: Kondylom HPV6 G und H).



**Abbildung 10:** Nachweis von  $\beta$ -Aktin-Transkripten in Tumoren und normaler Haut. (Ø1 und Ø2: Negativkontrolle ( $H_2O$ ) der Transkription mit Oligo dT- (OdT) und Zufallsnonomer-Primern (R9); ØRT: ohne reverse-Transkription; +: Positivkontrolle (human-DNA); M: 100bp Längenmarker).

#### 4.3.1.2.2. Analyse der revers transkribierten RNA-Extrakte mittels HPV9- und HPV38 spezifischer PCR

In keiner der untersuchten Biopsien aus 4.3.1.2.1. konnten E6-Onkogen-Transkripte der infizierenden HPV-Typen nachgewiesen werden.

#### 4.3.1.3. Viruslast des HPV-Typs 8 in gesunder Haut und Tumoren der Haut

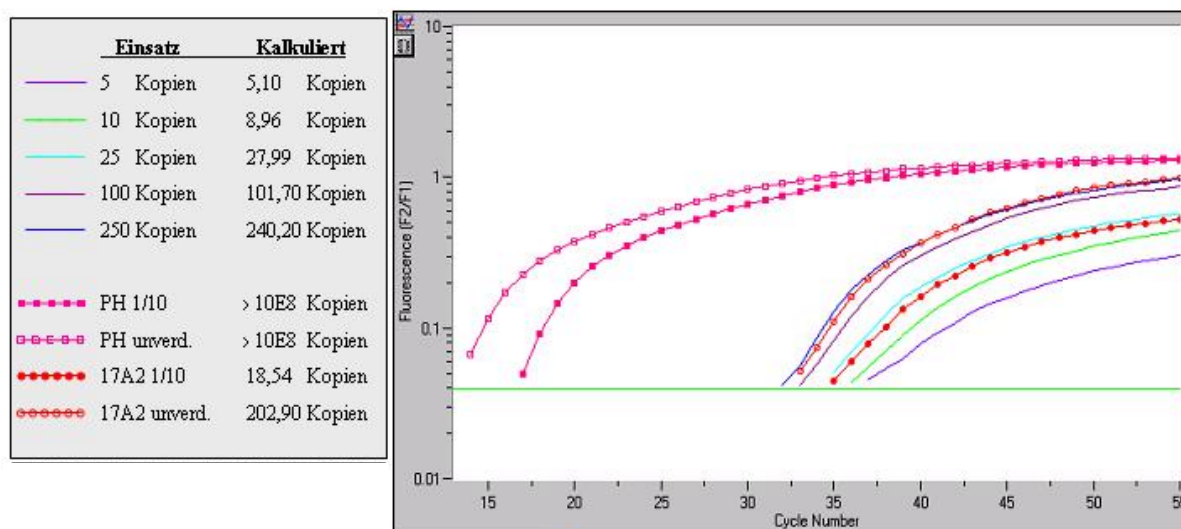
Zur Bestimmung der HPV8-Viruslast lagen drei Probenpaare nichtmelanozytärer Tumoren der Haut und gesunder Haut vor. Zum Vergleich wurde die HPV8-Viruslast einer chronisch eruptiven Papillomatose bestimmt (Tab. 13). Die Auswertung der Echt-Zeit-PCR der Patienten R17 (17A2) und PH ist in Abbildung 12 dargestellt.

Die Viruslast in Basaliomen lag zwischen einer HPV8-Kopie pro 445 bis 21 Zelläquivalenten. Von Patient R17 lagen zwei Basaliome vor. Die Quantifizierung ergab eine Viruslast von einer HPV8-Kopie pro 244 bzw. 21 Zelläquivalenten. Im DNA-Extrakt eines Plattenepithelkarzinoms (R53) lag eine Viruslast von einer HPV8-Kopie pro ca. 50000 Zelläquivalenten vor. Im Vergleich dazu lagen in der Biopsie der Papillomatose (PH) ca. 40000 HPV8-Kopien pro Zelläquivalent vor. Die Bestimmung

der Viruslasten der homologen gesunden Haut der Tumorpatienten lieferte, bis auf einen Fall (R17), erheblich höhere Werte als für die Tumoren (Tabelle 13).

Patient	Diagnose	HPV8-Kopie/ n Zelläquivalenten
R17	Basaliom	244
	Basaliom	21
	gesunde Haut	37
R26	Basaliom	445
	gesunde Haut	33
R53	Plattenepithelkarzinom	49135
	gesunde Haut	2183
PH	chron. eruptive Papillomatose	$2,5 \cdot 10^{-5}$ (=80664 HPV8-Kopien / Zelläquivalent)

**Tab. 13:** HPV8-Viruslast in Probenpaaaren nichtmelanozytären Tumoren der Haut und homologer gesunder Haut, sowie einer chronisch eruptiven Papillomatose.



**Abb. 12:** Auswertung der Echt-Zeit-PCR der Patienten R17 und PH. Die Bestimmung der Viruslast des Patienten PH, erfolgte in einem weiteren Lauf mit geeigneten Standards.



#### 4.3.2. Viruslast der HPV-Typen 5, 20 und 36 in gesunder Haut und Schuppen von Psoriatikern

In dieser Studie sollte die HPV-DNA-Last der mit Psoriasis assoziierten HPV-Typen 5, 20 und 36 bestimmt und verglichen werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich die HPV-DNA-Lasten in läsionalen Hautbereichen von denen gesunder Hautbereiche unterscheiden. Die DNA-Last der HPV-Typen 5, 20 und 36 in Biopsien von 61 Psoriasis-Patienten wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht.

Die HPV-Lasten in Psoriasis-Proben variierten zwischen 1 HPV-Genom pro mehr als 200000 Zelläquivalenten und 1 HPV-Genom pro 0,6 Zelläquivalenten. Die mittlere Viruslast ohne Ausreißer war am höchsten für HPV20, gefolgt von HPV5 und HPV36 (Tabelle 14).

1HPV-Kopie/ n Zelläquivalenten	HPV5 (n=19)	HPV20 (n=11)	HPV36 (n=41)
0.1-1	2 (11%)	1 (9%)	1 (3%)
>1-10	4 (21%)	0 (0%)	1 (3%)
11-100	1 (5%)	4 (36%)	6 (15%)
101-1000	4 (21%)	3 (27%)	6 (15%)
>1001	8 (42%)	3 (27%)	27 (66%)
<b>Spannweite</b>	0,6- 218000	0,6- 10100	0,7- 50000
<b>Mittelwert</b>	16800	1800	5000
<b>Mittelwert ohne Ausreißer*</b>	530	100	1050

**Tabelle 14:** HPV5-, 20- und 36-Lasten in psoriatischen Läsionen.

\*Ausreißer sind definiert als die Fälle, die unterhalb des 33er-Perzentils liegen

Acht Patienten waren mit mehreren der HPV-Typen infiziert, für die Protokolle zur Bestimmung der Viruslast etabliert worden waren. Bei diesen wurden die kumulativen HPV-DNA-Lasten berechnet (Tab. 15). Der Vergleich zeigte, daß zum Teil für die einzelnen HPV-Typen Lastunterschiede von mehr als einer Zehnerpotenz auftraten.

Patient	HPV36*	HPV5*	HPV20*	Kumulativ*
GC20	64,5		784	59,1
GC55	268,5		20,64	18,8
GC30	487		268	173
GC36	504,8		85,5	73,1
GC41	2640,6		10110	2094
GC38	598,5		34,2	32,4
GC19	50250	26326		17275
GC03	12290	41580		9486

**Tabelle 15:** HPV-DNA Lasten spezifischer Typen und kumulative HPV-DNA-Last bei Psoriasis-Patienten.

\* HPV-DNA-Lasten sind als eine HPV-Kopie/ x Zelläquivalenten angegeben

Bei fünf Patienten konnte die Viruslast desselben HPV-Typs sowohl in der psoriatischen Läsion, als auch in gesunder Haut bestimmt werden (Tab. 16). Ein einheitlicher Trend der psoriatischen Läsion oder der gesunden Haut zu höheren Viruslasten konnte nicht erkannt werden.

Patient	HPV-Typ	gesunde Haut*	psoriatische Läsion*
GC36	20	99,6	85,1
GC46	36	783,0	234,5
GC54	5	1,4	625,3
GC55	36	268,5	3783,5
GC79	5	0,6	1,9

**Tabelle 16:** HPV-DNA Lasten spezifischer HPV-Typen in psoriatischen Läsionen und homologer gesunder Haut.

\* HPV-DNA-Lasten sind als eine HPV-Kopie/ x Zelläquivalenten angegeben

### 4.3.3. HPV-Lasten in Zervikalabstrichen

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der HPV-DNA-Last in Zervixabstrichen unterschiedlicher Dysplasiegrade und der Vergleich der HPV-DNA-Lasten in Abstrichen HIV-infizierter und HIV-negativer Frauen. Weiterhin sollte der Einfluß der HIV-Infektion assoziierten Immunsuppression auf die HPV-DNA-Last in Zervixabstrichen und ein möglicher Einfluß antiretroviraler Therapie untersucht werden.

#### 4.3.3.1. HPV16-DNA Lasten in Zervixabstrichen HIV-negativer und HIV-positiver Frauen

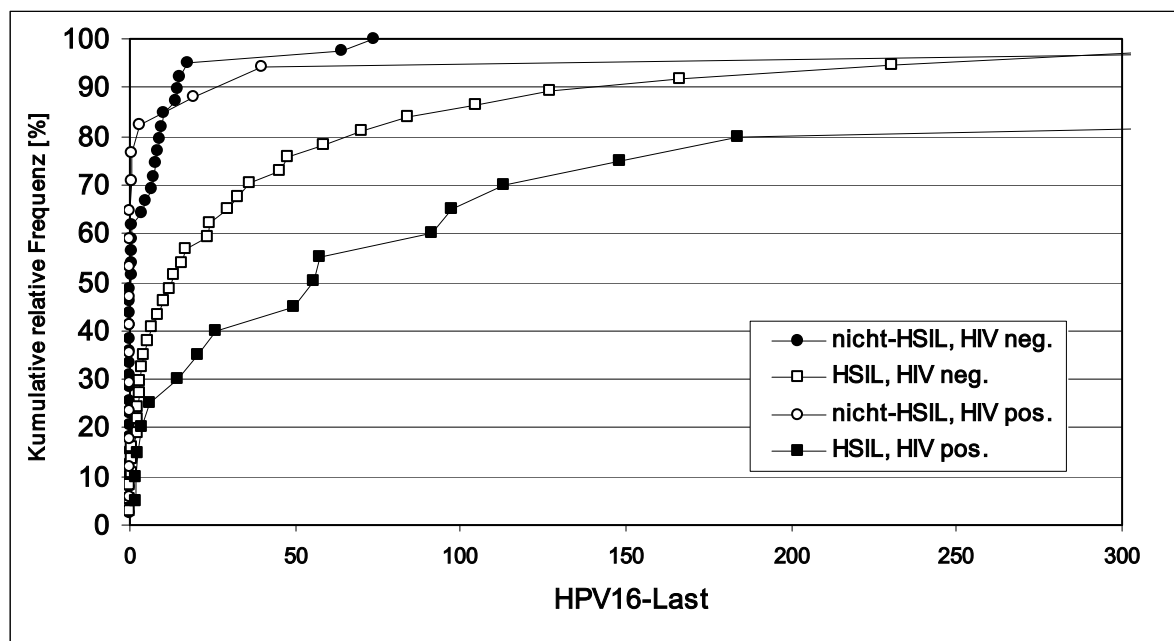
Die HPV16-DNA-Lasten in Abstrichen von 84 HIV-negativen und 55 HIV-positiven Patientinnen wurden bestimmt (Tabelle 17, Abb. 13). Die HPV16-Lasten lagen zwischen weniger als 0,1 und 465, bzw. weniger als 0,1 und 3686 HPV16-DNA Kopien/ $\beta$ -Globin Kopie bei HIV-negativen bzw. HIV-positiven Frauen.

Zytologie		HIV-neg.	HIV-pos.
normal	n	24	12
	Median	<0,1	<0,1
	80er Perz.	6,7	4,5
ASCUS	n	8	1
	Median	6,2	-
	80er Perz.	19,8	-
LSIL	n	10	10
	Median	0,6	1,3
	80er Perz.	17,0	34,1
HSIL	n	42	32
	Median	14,6	63,2
	80er Perz.	75,5	236,4

**Tabelle 17:** Mediane- und 80er-Perzentil-Lasten von HPV16 in Zervixabstrichen unterschiedlicher zytologischer Grade bei HIV-negativen und -positiven Patientinnen.

Die medianen und 80er-Perzentil Lasten stiegen sowohl bei HIV-negativen als auch bei HIV-positiven Patientinnen mit dem Grad der zugrundeliegenden Krankheit von

normal zu LSIL und HSIL (Tab. 17). Ein Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz des Viruslastunterschieds zwischen nicht-HSIL (normal, ASCUS, LSIL) und HSIL-Proben für HPV16 war hoch signifikant ( $p < 0.001$ ) für sowohl HIV-positive ( $n=31$ ) als auch HIV-negative ( $n=76$ ) Patientinnen.



**Abbildung 13:** Kumulative relative Frequenz in [%] von HPV16-Lasten in nicht-HSIL- (normal, ASCUS und LSIL) und HSIL-Abstrichen von HIV-negativen und HIV-positiven Frauen. HPV16-DNA-Lasten über 300 (HIV pos.,  $n = 5$ ; HIV neg.,  $n = 2$ ) werden nicht gezeigt.

Die Verteilung der Viruslasten in nicht-HSIL- und HSIL-Abstrichen HIV-positiver und HIV-negativer Patientinnen ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Graphen für nicht-HSIL-Abstriche von HIV-negativen und HIV-positiven Patientinnen sind nahezu identisch, die für HSIL-Abstriche unterscheiden sich deutlich. Die medianen- und 80er-Perzentil HPV-DNA-Lasten in Abstrichen HIV-positiver Frauen mit HSIL waren 4- bzw. 3-fach höher, als die HIV-negativer Frauen mit HSIL (Tab. 17). Die Signifikanz dieses Unterschieds wurde durch den Mann-Whitney-U-Test bestätigt ( $p = 0,041$ ; HIV+  $n=14$ , HIV-  $n=37$ ).

Die Unterschiede der HPV16-DNA-Lasten zwischen HIV-negativen und HIV-positiven Patienten mit nicht-HSIL-Abstrichen waren nicht signifikant ( $p = 0,417$ ; HIV+  $n=17$ , HIV-  $n=39$ ). Für HIV-negative Frauen zeigte sich eine hoch signifikante Assoziation von HPV16 Lasten größer als 0,1 mit HSIL ( $p < 0,001$ ;  $n=76$ ). Niedrigere HPV16-

Lasten als 1 wurden in Abstrichen von HIV-positiven Frauen mit HSIL (n=31) nie gesehen ( $p < 0.001$ ) und höhere Lasten als 10 waren hoch signifikant mit HSIL assoziiert ( $p = 0,001$ ).

Die Odds-Ratios für HIV-negative Patientinnen, bei HPV-DNA-Lasten über 0,1, 1 oder 10, an HSIL erkrankt zu sein, waren: 12,2 (CI 2,6-58,0), 8,3 (CI 2,8-24,5) und 6,0 (CI 2,1-17,1). Die entsprechenden Werte für HIV-positive Patientinnen waren 34,9 (CI 1,8-670,6), 41,2 (CI 2,1-778,7) und 17,1 (CI 2,9-101,9).

Die Spezifitäten und Sensitivitäten HSIL von nicht-HSIL, bei Schwellenwerten von 0,1, 1 oder 10 HPV16 Kopien/ $\beta$ -Globin-Kopie, bei HIV negativen Frauen und HIV-positiven Patientinnen zu unterscheiden, sind in Tabelle 18 angegeben.

Schwellenwert der HPV16-Last	Spezifität		Sensitivität	
	HIV-	HIV+	HIV-	HIV+
0,1	0,41	0,39	0,95	1,00
1	0,6	0,65	0,86	0,91
10	0,83	0,83	0,57	0,75

**Tabelle 18:** Spezifität und Sensitivität der Unterscheidung von HSIL und nicht-HSIL bei HPV16-Schwellen-Lasten von 0,1, 1 oder 10 bei HIV negativen Frauen und HIV-positiven Patientinnen.

Von drei HIV-negativen Patientinnen mit Zervixkarzinom, waren HPV16-positive Zervixabstriche verfügbar. In allen Fällen lagen hohe HPV16-Lasten (1, 263 und 373 HPV16 -Kopien/ $\beta$ -Globin-Kopie) vor.

Im Allgemeinen gilt die Histologie als Goldstandard für die Bestimmung des Dysplasiegrades. Dementsprechend unterschätzte die Zytologie die zu Grunde liegende Krankheitsschwere in acht HPV16 positiven Fällen (CINII n=1, CINIII n=7). In allen Fällen waren die HPV 16 Lasten höher als 1.

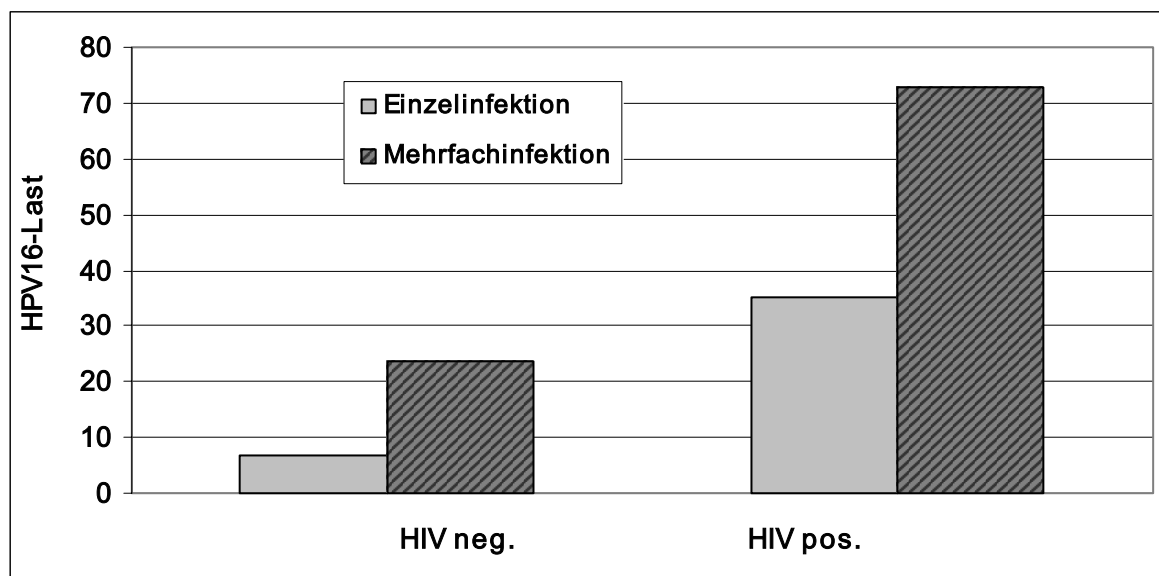
Von siebzehn Frauen mit normaler- oder LSIL-Zytologie, die durch HPV16-Lasten höher als 1 auffielen, wurde die Zytologie von einem unabhängigen Untersucher reevaluiert. Zwei dieser Abstriche (12%) wurden neu als Pap IVa / HSIL klassifiziert. Abstriche, die nach der Münchener Nomenklatur als PapIIID klassifiziert werden, werden in dem Bethesda -System teils unter LSIL (milde Dysplasie) und teils in HSIL

(moderate Dysplasie) eingeordnet. Die medianen- und 80er-Perzentil-HPV16-Lasten bei Abstrichen HIV-negativer und HIV-positiver Patientinnen mit PapIIID/LSIL bzw. PapIIID/HSIL sind in Tabelle 19 angegeben. Die Ergebnisse zeigen, daß unsere Quantifizierungsergebnisse besser mit dem Bethesda-System korrelieren als mit der Münchener Nomenklatur.

HPV16-Last	HIV-		HIV+	
	Median	80er Perz.	Median	80er Perz.
PapIIID/LSIL	0,6	17,0	1,3	34,1
PapIIID/HSIL	24,0	65,4	55,5	246,9

**Tabelle 19:** Mediane und 80er-Perzentil HPV16 Lasten bei Abstrichen HIV-negativer und HIV-positiver Patientinnen mit PapIIID/LSIL bzw. PapIIID/HSIL.

HPV16 Lasten in Abstrichen mit koinfizierendem(n) HPV Typ(en), wurden mit denen verglichen, bei denen lediglich HPV16 nachgewiesen wurde. Bei Patientinnen, die mit mehr als nur einem HPV Typ infiziert waren, wurden zwei- bis vierfach höhere mediane HPV16 Lasten in HSIL-Abstrichen gefunden als in solchen mit HPV16 alleine (HIV negative 23.7 vs. 6.7; n=42; HIV-positive; 72.8 vs. 35.0 n=32; Abb.14).



**Abbildung 14:** Vergleich der HPV16-Lasten bei HIV-negativen und HIV-positiven Patientinnen mit Einzel- und Mehrfach-HPV-Infektion.

#### 4.3.3.2. DNA-Lasten der HPV-Typen 18, 31, 33, 45 und 56 in Zervixabstrichen HIV-negativer und HIV-positiver Frauen

DNA-Lasten der HPV-Typen 18, 31, 33, 45 und 56 konnten in Zervixabstrichen von 80 HIV-negativen und 130 HIV-positiven Frauen bestimmt werden. Die HPV-DNA-Lasten lagen zwischen weniger als 0,1 und fast 20000 HPV-DNA Kopien pro  $\beta$ -Globin-Gen Kopie. Die höchsten Lasten der unterschiedlichen HPV-Typen, bei HIV-negativen und HIV-positiven Frauen, waren jeweils: HPV18: 591, 8623, HPV31: 2018, 1892, HPV33: 1781, 432, HPV45: 0,5, 19950 and HPV56: 1005, 3990. Die medianen HPV-Lasten der jeweiligen HPV-Typen variierten über mehr als zwei Größenordnungen. In der Gruppe der HIV-negativen Frauen wurde kein Fall mit HPV45-Lasten höher als 0,5 beobachtet. Außer diesem HPV-Typ waren alle HPV-Typen, sowohl bei HIV-negativen als auch bei HIV-positiven Patientinnen, auch durch sehr hohe Lasten repräsentiert (>50 HPV Kopien/ $\beta$ -Globin-Gen Kopie).

In nicht-HSIL-Proben wurden für die getesteten HPV-Typen keine bemerkenswerten Lastunterschiede zwischen HIV-negativen und HIV-positiven Patientinnen festgestellt. In HSIL-Proben von HIV-positiven Frauen lagen hingegen die medianen und 80er-Perzentil-HPV-DNA-Lasten der HPV-Typen 18, 31, 45 und 56 zwei- bis mehr als 10000-fach höher, als die von HIV-negativen Frauen ( $p=0,171$   $n=13$ ;  $p=0,622$   $n=19$ ;  $p=0,111$   $n=9$ ;  $p=0,177$   $n=11$ ;  $n$  gibt die Anzahl der gemäß 3.14. in statistische Berechnungen eingeflossenen Patientinnen an). Bei HPV33 waren die medianen- und 80er-Perzentil-Lasten in HSIL-Abstrichen bei HIV-positiven and HIV-negativen Frauen vergleichbar ( $p=0,967$   $n=19$ )(Tabelle 20).

		HPV18	HPV31	HPV33	HPV45	HPV56
HIV neg.	Median	<0,1 (5)	1,6 (15)	0,8 (6)	<0,1 (4)	30,2 (6)
	80er Perzentil	12,2	629,3	27,6	0,4	68,6
HIV pos.	Median	15,4 (18)	86,3 (11)	1,1 (20)	0,5 (15)	266,1 (24)
	80er Perzentil	261,0	1317,6	26,5	4717,8	785,5

**Tabelle 20:** DNA-Lasten der HPV-Typen 18, 31, 33, 45 und 56 in HSIL-Abstrichen von HIV-negativen und -positiven Patientinnen.

(Die Anzahl der untersuchten Proben ist in Klammern angegeben)

Abstriche von Patientinnen mit Zervixkarzinom waren nur von einer HIV-positiven Patientin mit HPV33 verfügbar (432 HPV33 Kopien/ $\beta$ -Globin Kopie; Tabelle 22, Patient A).

#### **4.3.3.3. Mediane HPV-DNA-Lasten HIV-positiver Frauen differenziert nach CD4-Zellzahl, AIDS-Status und HIV-RNA-Last**

Die medianen- und 80er-Perzentil-Lasten der HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 45 oder 56 bei HIV-positiven Patientinnen mit HSIL, differenziert nach der CD4-Zellzahl, dem AIDS-Status und der HIV-RNA-Last, sind in Tabelle 21 angegeben. Im Allgemeinen lagen die medianen- und 80er-Perzentil-HPV-DNA-Lasten der Patientinnen mit stark reduzierter Immunkompetenz ( $CD4 < 200/\mu l$ , AIDS), oder HIV-RNA  $\geq 10^4$  Kopien/ml, höher, als bei Patientinnen mit  $CD4$ -Zellzahlen  $\geq 200/\mu l$ , keinem AIDS oder HIV-RNA  $< 10^4$  Kopien/ml. Dabei wurden 2 bis 2000-fach erhöhte HPV-DNA-Lasten beobachtet.

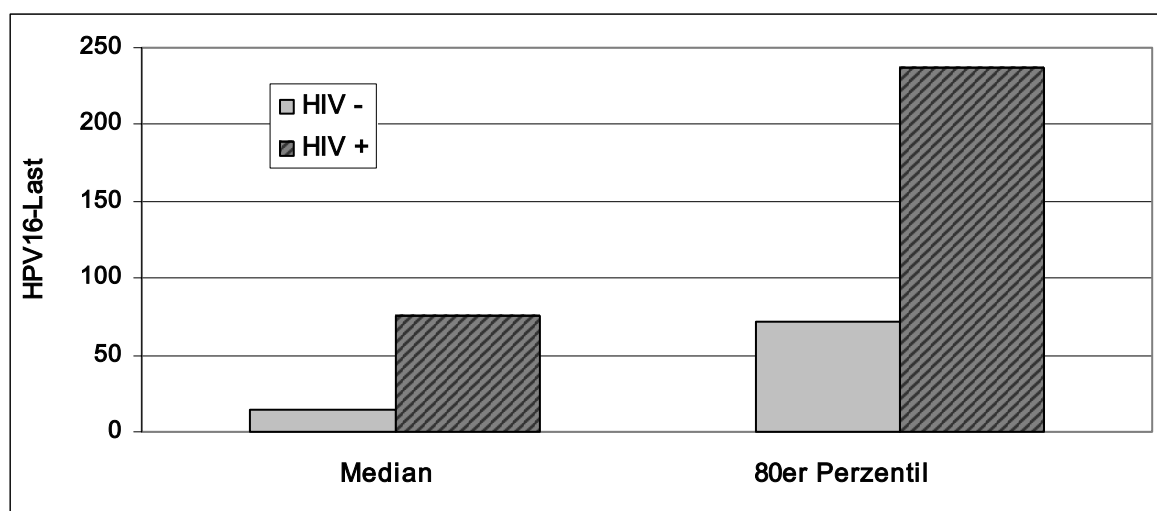
Der Großteil der untersuchten Patientinnen wurde antiretroviral therapiert (67%). Patientinnen ohne detektierbare HIV-RNA ( $< 50$  Kopien/ml) wurden als erfolgreich behandelt klassifiziert. Interessanterweise zeigte sich, daß selbst erfolgreich antiretroviral behandelte, HIV-positive Patientinnen mit HSIL ( $n=10$ ), verglichen mit HIV-negativen Patientinnen mit HSIL ( $n=42$ ), 5-fach höhere mediane- (14.6 vs. 71.3) und 3-fach höhere 80er-Perzentil- (75.5 vs. 236.8) HPV16-DNA-Lasten hatten (Abb. 15). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch, wenn nur Patientinnen mit  $CD4$ -Zellzahlen  $> 500/\mu l$  berücksichtigt wurden.



	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV45	HPV56
<b>CD4 ≥200/μl</b>	57,5/215,1 (21)	1,1/12,5 (8)	5,9/200,0 (5)	0,6/22,2 (13)	1,9/10830 (8)	227,0/785,5 (14)
<b>CD4 &lt;200/μl</b>	80,9/435,8 (11)	157,6/3153,2 (10)	554,6/1746,2 (6)	3,5/206,1 (6)	<0,1/8,0 (7)	276,8/815,5 (10)
<b>kein AIDS</b>	17,5/183,8 (14)	1,8/15,6 (7)	119,5/239,0 (2)	0,3/20,8 (14)	1,7/3,3 (2)	232,9/1241,4 (8)
<b>AIDS</b>	72,8/303,3 (18)	132,5/2435,7 (11)	86,3/1526,8 (9)	7,0/223,6 (5)	0,5/6424,4 (13)	270,9/845,8 (16)
<b>HIV-RNA &lt;10<sup>4</sup>/ml</b>	59,6/236,4 (22)	5,8/277,7 (15)	65,2/1599,9 (8)	<0,1/6,9 (15)	0,5/7486,7 (11)	272,1/584,4 (19)
<b>HIV-RNA ≥10<sup>4</sup>/ml</b>	85,0/2214,5 (7)	132,5/182,8 (3)	239,0/1003,7 (3)	153,5/241,2 (3)	1,4/15,8 (4)	450,8/1764,1 (4)

**Tabelle 21:** Mediane-/80er-Perzentil-HPV-DNA Lasten der HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 45 und 56 in HSIL von HIV-positiven Patientinnen differenziert nach der CD4-Zell-Zahl, dem AIDS-Status und der HIV-RNA-Last.

(Die Anzahl der untersuchten Proben wird in Klammern angegeben)



**Abbildung 15:** Vergleich der HPV16-Lasten von erfolgreich antiretroviral therapierten HIV-positiven Patientinnen mit HSIL mit denen von HIV-negativen Patientinnen.

#### 4.3.3.4. Verlauf der HPV-DNA-Last bei individuellen HIV-positiven Patientinnen

Tabelle 22 zeigt Daten fünf HIV-positiver Patientinnen, von denen jeweils mindestens vier konsekutive Abstriche vorlagen. Bei einer der Patientinnen kam es, ohne chirurgischen Eingriff, zu einer Regression von HSIL zu normal (B). In diesen Fällen konnte ein starker Abfall der HPV-DNA-Last, bzw. das Verschwinden detektierbarer HPV-DNA-Mengen beobachtet werden. Bei operativ behandelten Patientinnen, von denen spätere Abstriche vorlagen (A, C, D), war nach dem Eingriff und bei normaler Zytologie keine HPV-DNA mehr nachweisbar. Bei einer Patientin wurden hohe HPV-DNA-Lasten (>1 Kopie HPV-DNA/ $\beta$ -Globin Kopie) schon 12 Monaten vor der Entstehung von HSIL (E) gezeigt.

#### 4.4. HPV16-DNA-Lasten in mikrodissezierten Tumorzellen von Zervixkarzinomen

Um HPV-DNA-Lasten in Abstrichen verschiedener Krankheitsgrade, mit denen in Zellen von Zervixkarzinomen zu vergleichen, wurden Tumorzellen wie unter 3.13. beschrieben mikrodisseziert und deren HPV16-DNA-Last bestimmt. Es waren drei HPV16 positive Zervixkarzinome von HIV-negativen Patientinnen verfügbar. Als Durchschnitt von je mindestens fünf Tumorarealen ergaben sich Lasten von 4, 9 und 10 HPV16-Kopien pro  $\beta$ -Globin Kopie.

Patient	HPV-Typ	0m	3m	6m	9m	12m	15m	18m	21m	24m
A	33	LSIL	HSIL	CC ✕	nl	nl	nl	nl	nl	
		26	7	432	neg	neg	neg	neg	neg	
B	16	HSIL	HSIL	LSIL	LSIL	LSIL	nl			
		1581	neg	neg	neg	<0.1		neg		
	56	20	14	1		neg		<0.1		
C	16	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL ✕				LSIL
		3383		78	96	43				40
	31	1004		86	106	42				neg
	33	154		0.5	neg	neg				<0.1
	45	3		<0.1	<0.1	16				neg
D	16	nl		nl		HSIL ✕				nl
		3		7		21				neg
E	16	LSIL	LSIL	LSIL		HSIL				
		645	11	2		98				

**Tabelle 22:** Verlauf der HPV-DNA-Lasten bei individuellen HIV-positiven Frauen (m: Monat; ✕: operativ behandelt; CC: Zervixkarzinom; nl: normale Zytologie).

## V. DISKUSSION

Zahlreiche epidemiologische und molekularbiologische Untersuchungen haben sich mit der Rolle von HPV in der Ätiologie epithelialer Tumoren beschäftigt. Bis heute gibt es jedoch nur wenige Untersuchungen, die sich mit Bedeutung der Viruslast für die Pathogenese beschäftigen. Daher waren die Ziele dieser Arbeit die Entwicklung und Etablierung einer verlässlichen Methode zur Bestimmung von HPV-DNA-Lasten und eine diesbezügliche Untersuchung verschiedener tumoröser und nicht-tumoröser HPV-assoziiierter Erkrankungen. Dabei sollte vor allem die Viruslast in pathologisch verändertem und gesundem Gewebe verglichen werden. Ein besonderes Augenmerk galt ferner den möglicherweise unterschiedlichen Virusspiegeln in den gutartigen Läsionen der Psoriasis und malignen Tumoren der Haut. Als Gruppe mit etablierter HPV-Ätiologie sollten im Rahmen einer prospektiven Studie zervikale Abstriche mit typspezifischen, quantitativen Echtzeit-PCR-Protokollen für genitale Hochrisiko-HPV-Typen untersucht werden.

Zur Bestimmung der HPV-DNA-Last wurde im Rahmen dieser Arbeit die innovative Methode der Echtzeit-PCR im Sondenhybridisierungsformat verwendet. Bei HPV-Infektionen liegt zum Teil die virale DNA nur in sehr kleinen Kopienzahlen vor. Weiterhin werden regelmäßig multiple Infektionen beobachtet. Daher war es notwendig, Protokolle zu etablieren, die eine sowohl sensitive als auch typspezifische Quantifizierung erlauben. Um diese Forderungen erfüllen zu können, wurden für jeden HPV-Typ sowohl individuelle Primer als auch individuelle Sonden entworfen. Diese Primer-Sondenkombinationen wurden in aufwändigen Versuchsreihen optimiert. Dabei wurde besonderer Wert auf die Verlässlichkeit der Quantifizierung in Gegenwart koinfizierender HPV-Typen, die Reproduzierbarkeit der Messwerte bei wiederholter Quantifizierung, und die Robustheit der Protokolle bei kleinen Variationen der Konzentrationen von Magnesiumchlorid, der Primer und der dNTPs gelegt. Insgesamt wurden fünf Protokolle für die Quantifizierung von kutanen- bzw. Epidermodysplasia verruciformis-(EV)-HPV-Typen und sechs Protokolle für die Quantifizierung von genitalen Hochrisiko-HPV-Typen entwickelt, die reproduzierbar und präzise eine sensitive und typspezifische Quantifizierung der HPV-DNA-Last ermöglichen.

Für NMHT wurden HPV-DNA-Lasten von einer HPV-Kopie pro 20 bis ca. 5000 Zelläquivalente ermittelt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß für die Bestimmungen DNA-Extrakte aus Stanzbiopsien verwendet wurden, die bis zu zwei Dritteln Zellen nicht epithelialen Ursprungs enthielten. Daher ist anzunehmen, daß die effektiven Viruslasten des Epithels höher liegen. Über in-situ-Hybridisierung konnte erstmals für prämaligne und maligne Tumoren der Haut von nicht EV-Patienten die Lokalisation der HPV-DNA gezeigt werden. Dabei stellte sich heraus, daß nur vereinzelte Zellen nachweisbare HPV-DNA enthielten. Somit konzentriert sich die niedrige Gesamt-viruslast auf einige wenige Zellen der Epidermis, in denen möglicherweise das Virus vegetativ repliziert. Die Bestimmung der Viruslasten der homologen gesunden Haut der Tumorpatienten ergab in allen bis auf einen Fall 10- bis 20-fach höhere Werte als für die Tumoren. Im Gegensatz dazu waren durch in-situ-Hybridisierung keine HPV-positiven Zellen in gesunder Haut nachzuweisen. Dies spricht für niedrige HPV-DNA-Lasten in Einzelzellen normaler Haut. Möglicherweise sind aber insgesamt mehr Zellen HPV infiziert, ohne daß es zu einer beobachtbaren vegetativen Replikation kommt. Andererseits könnte der Eindruck einer scheinbar höheren Viruslast in gesunder Haut durch die physiologische Keratinisierung der äußeren Schichten entstehen. Dadurch kommt es, im Gegensatz zur parakeratotisch verlaufenden Differenzierung des Tumorepithels, zu einem Verlust der Zellkerne und der DNA. Dies würde eine geringere Anzahl untersuchter Zellen in Proben normaler Haut und somit höhere Viruslasten vorspiegeln. Einschränkend ist zu bemerken, daß die geringe Zahl der bisher untersuchten Proben eventuell nicht repräsentativ für Hauttumoren ist. Es sind Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven mit der etablierten Methode notwendig. Die allgemein niedrige Viruslast wird jedoch durch frühere, negative Southern Blot Hybridisierungen gestützt (Kawashima et al., 1990).

Für den Nachweis transkriptioneller Aktivität von HPV in NMHT wurden nested-PCR-Protokolle entwickelt, die eine Sensitivität von weniger als 10 Kopien für das E6-Onkogen des infizierenden HPV-Typs aufwiesen. Es war auch mittels dieser hochsensitiven Methode nicht möglich, E6-mRNA in NMHT und homologer Haut nachzuweisen. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß kleine Mengen viraler RNA im Laufe der Lagerung und als Folge nicht adäquater Archivierung der ursprünglich nicht für diese Fragestellung vorgesehenen Proben degradiert wurden. Weiterhin könnte aufgrund der nur wenigen HPV-positiven Zellen RNA in nicht

detektierbarer Menge vorliegen. Die Effizienz der reversen Transkription in vitro wird auf lediglich ca. 20-40% eingeschätzt. Allerdings sollte die RNA durch Transkription der viralen DNA amplifiziert werden. Dies läßt somit zumindest den Schluß zu, daß in den untersuchten Tumoren keine amplifizierende Transkription von E6 stattfindet. Eine größere Untersuchung mit frischen, optimal konservierten Proben könnte zu anderen Ergebnissen führen. Weiterhin könnte bei Verfügbarkeit größerer Biopsien auf die Transkription anderer, für den Replikationszyklus wichtiger Gene getestet werden.

Zum Vergleich wurde eine HPV8 infizierte Papillomatose untersucht. Im Unterschied zu NMSC handelt es sich bei dieser Läsion um eine benigne Erkrankung der Haut, die von massiver Proliferation des Epithels geprägt ist. Die Analyse zeigte extrem hohe Viruslasten (ca. 40000 HPV8-Kopien pro Zelläquivalent), die auf eine massive Replikation schließen lassen. Durch in-situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, daß ein Großteil der epithelialen Zellen HPV-positiv ist. Diese Viruslast und der Befund der in-situ-Hybridisierung decken sich mit denen einer HPV7-assoziierten perioralen Warze. Dort wurden 15000 und 33000 Kopien pro Zelläquivalent und eine uniforme Infektion der Warzenzellen gezeigt (Ritzkowsky et al., 2001).

Es ist also festzustellen, daß die Viruslasten in NMHT sehr klein sind und höchstwahrscheinlich nicht jede Krebszelle mit HPV infiziert ist. Dies erklärt die Notwendigkeit hochsensitiver nested-PCR-Protokolle zum Nachweis von HPV-DNA in NMSC. Unter der Annahme, daß HPV für die Aufrechterhaltung des malignen Status nicht notwendig ist, läßt sich die Rolle von HPV für die Entwicklung von NMHT nach dem „hit-and-run“-Mechanismus interpretieren (Campo, 1997; Pfister, 1990). Das Genom kutaner Papillomviren liegt in der Regel extrachromosomal vor. Ein Mechanismus, der die Verteilung von nicht integrierter DNA an die Tochterzellen während der Zellteilung steuert, ist nicht beschrieben. Demnach könnte es, nach der Karzinogenese unter Beteiligung papillomaviraler Proteine zu einer Ausdünnung bzw. einem Verlust der HPV-DNA erst in einzelnen Zellen und Zellarealen und schließlich in dem gesamten Tumor kommen. Bei immunsupprimierten Patienten wurde eine erhöhte Inzidenz virus-assoziierten Karzinome beobachtet. Die analoge Beobachtung eines gegenüber Immunkompetenten hundertfach erhöhten Risiko für die Entwicklung von SCC und eines zehnfach Erhöhten für BCC bei Transplantat-

empfängern, spricht für eine kausale Rolle einer HPV-Infektion. Eine serologische Studie zeigte, daß der Nachweis von Antikörpern gegen HPV8-virus-like-particles mit dem Auftreten einer hohen Anzahl solarer Keratosen und mit Plattenepithelkarzinomen assoziiert ist. UVB-Strahlung gilt als wichtigster ätiologischer Faktor für die Entwicklung von NMHT. Auf molekularer Ebene deutet die Fähigkeit von papillomaviralem E6-Protein das zelluläre Protein Bak zu binden und damit dessen proteolytischen Abbau einzuleiten, auf eine Beteiligung kutaner HPVs in der Karzinogenese hin. Für Bak wurde gezeigt, daß es eine wichtige Rolle bei der Apoptose als Antwort auf Schädigung durch UVB-Strahlung spielt. Somit könnte es in HPV-infizierten Zellen zu einer Akkumulation von Mutationen kommen, die zu der Entwicklung von NMHT führen (Jackson, 2000). Bei EV-Patienten gelten pityriase Flecken als Vorläufer der Hautkarzinome. Von diesen Warzen ist bekannt, daß HPV-DNA in großen Mengen und einer Vielzahl von Zellen der Epidermis vorliegt (Croissant et al., 1985). Der in-situ-Nachweis von HPV5-DNA-Hybriden in einem Karzinom eines EV-Patienten gelang jedoch lediglich in ca. jeder 10000-sten Zelle (Orth et al, 1980). Diese Ergebnisse weisen eine Analogie zu der vorliegenden Studie und somit auch zum beschriebenen Mechanismus auf. Interessant ist auch, daß bei der Erythroplasie Queyrat, einem in-situ Karzinom, für das HPV8 Präsenz als definierend vorgeschlagen wurde, HPV8-DNA-Lasten in vergleichbarer Höhe wie bei NMHT ermittelt wurden (Wieland et al., 2000a).

Die Bestimmung der Viruslasten von HPV5, 20 und 36 in Proben psoriatischer Läsionen ergab, daß die Spannbreite sehr groß ist und von einem HPV-Genom pro 0,6 bis mehr als 200000 Zelläquivalenten reicht. Im Mittel betrug sie ein virales Genom pro ca. 1000 Zelläquivalenten. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in den Viruslasten der unterschiedlichen Typen festgestellt werden. Der Vergleich der Viruslasten in psoriatischen Läsionen und der gesunden Haut zeigte keinen einheitlichen Trend zu höheren Lasten in läsionalen Bereichen. Der Effekt der parakeratotischen Verhornung psoriatischer Läsionen unter Erhalt der Zellkerne, im Gegensatz zu gesunder Haut mit physiologischer Keratinisierung unter Verlust der DNA, ist schwer einzuschätzen. Eine Verzerrung zu niedrigeren HPV-Kopie/Zelläquivalent-Quotienten in psoriatischen Läsionen erscheint jedoch möglich. Somit sind höhere HPV-Lasten in psoriatischen Läsionen als in gesunder Haut nicht auszuschließen. Dies wird auch durch die gefundenen höheren Prävalenzen von

HPV-DNA in psoriatischen Hautläsionen im Vergleich zu gesunder Haut gestützt (63,5% gegenüber 43,5%).

Wie bei Christophers (1996) beschrieben, gibt es Anzeichen, daß bakterielle Antigene, Proteine oder Toxine als Superantigene wirken können. Bei 45% der Psoriasis vulgaris-Patienten können geringfügige Traumen als auslösender Faktor wirken. Es wird angenommen, daß es sich letztlich um eine durch T-Zellen vermittelte Autoimmunkrankheit handelt (Valdimarsson et al., 1997). Nickoloff und Wrone-Smith haben die Superantigen und die Autoimmunhypothese in einem Mehrschrittmodell zusammengefasst. Nach lokaler Aktivierung von T-Zellen durch ein Autoantigen oder ein endogenes Antigen und einer Aktivierung der Keratinozyten, kommt es infolge der Hyperplasie der Epidermis zur Produktion und Präsentation von Antigenen und somit zur Aufrechterhaltung der Krankheitserscheinungen. Es wurde spekuliert, daß Proteine der HPVs als „Autoantigen“ wirken können (Weissenborn, 1998; Majewski et al., 1999). Weiterhin ist es möglich, daß papillomavirale Proteine kreuzreagierende Antigene aufweisen, die in der Lage sind, eine Subpopulation von Lymphozyten zu stimulieren, deren Aktivität sich dann gegen lokale Autoantigene epidermaler Zellen richtet. Demnach stellen HPVs eventuell einen Stimulus der Immunantwort dar und könnten auch in den beobachteten geringen Mengen wirken. Ob sich die Papillomvirus-Infektionen der Haut in die Pathologie der Psoriasis einordnen lassen, oder ob psoriatische hyperproliferative Läsionen lediglich die Replikation ermöglichen, bleibt zu untersuchen. Eine Klärung dieser Fragestellung erlaubt möglicherweise ein Lymphozyten-Transformations-Tests (LTT) peripherer T-Zellen von Psoriatikern mit verschiedenen papillomaviralen Antigenen.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurden als Tumorgruppe mit etablierter HPV-Ätiologie zervikale Abstriche von HIV-negativen und HIV-positiven Frauen untersucht. HIV-infizierte Frauen haben ein 5 bis 13-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Zervixkarzinomen verglichen mit HIV-negativen Frauen (Frisch et al., 2001; Serraino et al., 1999a; Walboomers et al., 1999a).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von PCR basierten Endpunkt-Assays von Swan et al., für die HPV-Typen 16, 18, 31 und 45, unterschieden sich auch in der vorliegenden Arbeit die medianen HPV-Lasten der verschiedenen HPV-Typen um mehr als zwei Größenordnungen. Diese Ergebnisse deuten auf unterschiedliche



replikative Potentiale und/oder typ-spezifische Variationen der immunologischen Kontrolle hin. HPV45 war der einzige HPV-Typ, für den bei HIV-negativen Frauen in keinem Fall eine Viruslast über 0,5 Kopien pro  $\beta$ -Globin-Kopie gefunden wurde. Desgleichen hatten Swan et al. wesentlich niedrigere mediane Viruslasten für HPV45 als für HPV16, 18 und 31 beobachtet. Dies könnte in vergangenen Studien mit PCR-Protokollen geringer Sensitivität zu einer Unterschätzung der HPV45-Prävalenz geführt haben.

Ein Nachteil der Routine-Untersuchung von Pap-Abstrichen zur Vorbeugung von Zervixkarzinomen ist die Verwendung morphologischer Parameter, die einer subjektiven Bewertung unterliegen. In zwei Metaanalysen wurde kürzlich berichtet, daß die Sensitivitäten dieser Methode im Durchschnitt um 50% liegen aber auch niedrige Werte wie 11% beobachtet wurden (Fahey et al., 1995; Nanda et al., 2000). Zwar konnte gezeigt werden, daß der Nachweis von hochgradigen Läsionen durch qualitative HPV-DNA-Tests sensitiver ist, aber die hohe HPV-DNA-Prävalenz bei sexuell aktiven Frauen mit bis zu 50%, führt zu einer hohen Rate an falsch positiven Ergebnissen und somit zu einer niedrigen Spezifität. Einige Studien haben gezeigt, daß erhöhte Viruslasten einen prädiktiven Charakter für den Schweregrad der zugrunde liegenden Läsion haben können.

Ein Anstieg der Viruslast mit steigendem Grad der Läsion wird durch die hier präsentierten Daten bestätigt. Weiterhin erwiesen sich die Differenzen der HPV16-Lasten zwischen nicht-HSIL- und HSIL-Abstrichen sowohl bei HIV-negativen als auch bei HIV-positiven Frauen als hochsignifikant. Allerdings wurden in Einzelfällen sowohl sehr hohe HPV-DNA-Lasten für nicht-HSIL- als auch sehr niedrige HPV-DNA-Lasten für HSIL-Abstriche beobachtet. Daher war es, wie auch in Vorgängerstudien nicht möglich, einen klaren Grenzwert zur Unterscheidung der Schweregrade zu definieren. Unabhängig davon waren bei HIV-negativen Frauen HPV16-Lasten  $>1$  hoch signifikant mit HSIL assoziiert (OR=8,3). Bei HIV-positiven Frauen mit HSIL wurden niemals HPV16-Lasten  $<1$  beobachtet (OR=41,2). Bemerkenswerterweise konnten durch Anwendung dieses Grenzwertes von  $>1$  HPV-Kopie/ $\beta$ -Globin-Gen-Kopie zehn HPV16-positive Fälle mit hochgradiger Dysplasie identifiziert werden, die durch das initiale zytologische Screening nicht erkannt worden waren.

Die Untersuchung des Einflusses der HIV-Infektion zeigte interessanterweise 4- bis

mehr als 1000-fach höhere mediane- und 2 bis mehr als 10000-fach höhere 80er-Perzentil-Lasten der HPV-Typen 16, 18, 31, 45 und 56 bei HIV-infizierten Frauen mit HSIL im Vergleich zu HIV negativen Frauen. Die HPV-Lasten der Abstrichgrade Normal, ASCUS und LSIL hingegen waren bei HIV-negativen und HIV-positiven Frauen vergleichbar. Möglicherweise repräsentieren die bei niedriggradigen Läsionen beobachteten HPV-DNA-Lasten dieser Typen inapparente bzw. entstehende oder regredierende Läsionen, die unter der Kontrolle des Immunsystems stehen.

Erhöhte HPV33-Lasten wurden überraschenderweise erst bei stark immunsupprimierten HIV-positiven Patientinnen mit HSIL beobachtet. Dies könnte darauf hindeuten, daß die immunologische Kontrolle von HPV33, anders als bei den anderen Hochrisikotypen, erst in einem späten Stadium der HIV-Infektion versagt.

Aus Abschätzungen unterschiedlich sensitiver Methoden (PCR vs. Southern Blot) hatten Heard et al. (2000) festgestellt, daß stark immunsupprimierte, HIV-positive Frauen (CD4 Zellzahl <200/µl Plasma) doppelt so häufig hohe HPV-DNA-Lasten haben wie weniger stark immunsupprimierte HIV-positive Frauen. Die Analyse der hier vorliegenden Daten zeigte, daß bei Frauen mit HSIL im allgemeinen Parameter, die eine verringerte Immunkompetenz anzeigen (CD4 Zellzahl <200/µl, AIDS) oder hohe HIV-RNA-Lasten, mit zwei- bis mehr als 2000-fach höheren HPV-DNA-Lasten assoziiert sind. Diese Ergebnisse unterstreichen den Einfluß der Immunkompetenz auf die Höhe von HPV-DNA-Lasten. Dieser Effekt ist dabei nicht auf einzelne HPV-Typen beschränkt, scheint aber bei HPV18 stärker ausgeprägt zu sein.

In vielen epidemiologischen Studien wurde gezeigt, daß nahezu alle Frauen mit HSIL HPV-infiziert sind. Dem steht entgegen, daß es nur bei einem geringen Anteil dieser Frauen zur Entwicklung eines Zervixkarzinoms kommt (Holowaty et al., 1999). Die Daten in dieser Untersuchung zeigen, daß Immunsuppression zu höheren Lasten des primären ätiologischen Agens führt und damit den natürlichen Verlauf einer SIL beeinflusst. Zu welchem Grad hohe HPV16 Lasten bei HIV-negativen Frauen mit einer signifikanten zervikalen Pathologie verknüpft sind, zeigte kürzlich eine retrospektive Studie von Josefsson and Ylitalo. Frauen, deren HPV16-DNA-Lasten sich im obersten Quintil bewegten, wiesen ein sechzigfach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms zu einem späteren Zeitpunkt auf. Die Autoren

schlossen daraus, daß man aus der Analyse der HPV-DNA-Lasten das Risiko für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms vorhersagen kann. Bei HIV-positiven Patientinnen könnte die verminderte Immunabwehr zu einer gestörten Elimination selbst der infizierten Keratinozyten mit den höchsten HPV-Lasten führen. Die verlängerte Persistenz von HPV-Infektionen, die aggressivere Entwicklung, die verminderte Regressionsrate und die schnellere Progression zu Zervixkarzinomen könnte durch höhere HPV-DNA-Lasten erklärt werden. Dabei ist es wichtig, noch hinzuzufügen, daß in dem untersuchten Patientenkollektiv die HIV-positiven Patientinnen, besonders die mit starker Immunsuppression, regelmäßig mit mehr als einem Hochrisiko-HPV-Typ infiziert waren (Funke, Weissenborn in Vorbereitung) und daß eine Koinfektion stark mit hohen HPV-DNA-Lasten assoziiert war.

Von besonderem Interesse ist, daß die medianen HPV16-Lasten der erfolgreich antiretroviral therapierten Patientinnen mit HSIL immer noch fünffach höher lagen als die HIV-negativer Kontrollpatientinnen. Dies mag erklären, warum die Inzidenz von Zervixkarzinomen seit der Einführung von HAART um das fünffache angestiegen ist, während die Inzidenz der meisten opportunistischen Infektionen zurückgegangen ist (Dorrucci et al., 2001). Die meisten erfolgreich therapierten Patientinnen scheinen immer noch eine verminderte Fähigkeit zur Kontrolle HPV-infizierter Keratinozyten zu haben. Die Lebenserwartung von Patienten mit HAART ist erhöht. Durch die verlängerte Exposition gegenüber hohen HPV-DNA-Lasten bei diesen Patientinnen ist daher mit einem weiteren Anstieg der Zervixkarzinom-Inzidenz in den nächsten Jahren zu rechnen. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Greenspan et al. gestützt, die einen sechsfachen Anstieg der Inzidenz von HPV-assoziierten Warzen des Mundraumes bei HIV-positiven Patienten mit HAART feststellten.

Einzelmessungen der HPV-DNA-Last geben lediglich einen Schnappschuß des HPV-Infektionsstatus zwischen der Ansteckung und der Klärung der Infektion oder der Progression zu HSIL oder Zervixkarzinom wieder. In einer Langzeitstudie nutzten Woodman et al. eine semiquantitative Methode zur Unterscheidung von hohen und niedrigen HPV-DNA-Lasten. Sie berichten, daß niedrige HPV-DNA-Lasten in der Regel zu Beginn und am Ende einer Infektion auftreten. Daten von einzelnen HIV-positiven Patienten dieser Studie geben weitere Einblicke in den Verlauf der HPV-DNA-Lasten. Bei Patientinnen mit regredierender zervikaler Läsion wurden

abnehmende HPV-DNA-Lasten, bis unter die Nachweisgrenze, beobachtet. Bei Patientinnen, welche HSIL entwickelten, wurden bereits bis zu einem Jahr vorher erhöhte HPV-DNA-Lasten beobachtet. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von Ylitalo et al., die in einer retrospektiven Studie erhöhte HPV16-Lasten bis zu 13 Jahre vor der Diagnose von Zervixkarzinomen feststellten.

Die Korrelation zwischen hoher transkriptioneller Aktivität und einem erhöhten Krankheitsrisiko ist etabliert. Zelltransformationsversuche mit BPV1 zeigten eine positive Korrelation von hohen RNA-Spiegeln mit erhöhtem tumorigenem Potential. Die unterschiedlich starke Assoziation von HPV16-Varianten mit Zervixkarzinomen wurde auf Unterschiede in der Aktivität des Onkogenpromotors zurückgeführt (Veress et al., 1999). Romanczuk und Villa haben gezeigt, daß die transkriptionell regulative Region die Hauptdeterminante der unterschiedlichen transformierenden Aktivität von HPV16 und HPV18 ist (Villa et al., 1991). Die Vermutung liegt nah, daß hohe HPV-DNA-Lasten auf eine erhöhte replikative und transkriptionelle Aktivität mit erhöhten Konzentrationen viraler Onkogene schließen lassen. Dies ist jedoch noch nicht gezeigt worden und könnte das Objekt einer weiteren Studie sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß die hier für zervikale Abstriche vorgelegten Daten starke Argumente für die Erklärung des erhöhten Risikos HIV-positiver Frauen für HSIL und evtl. Zervixkarzinom aufgrund höherer HPV-DNA-Lasten liefern. Weiterhin könnten die Beobachtungen eine Erklärung für die Grenzen von HAART in Bezug auf HPV-assoziierte Erkrankungen geben. Die Rolle von erhöhten HPV-DNA-Lasten sollte in prospektiven Studien untersucht werden. HPV-DNA-Last-Bestimmungen könnten in Zukunft bei der Identifizierung von Patientinnen mit hohem Krebsrisiko hilfreich sein und zu flexibleren Untersuchungsintervallen führen. Wiederholt festgestellte hohe HPV-DNA-Lasten sollten als alarmierend für ein erhöhtes Krebsrisiko gewertet werden. Die Trennschärfe der HPV-DNA-Lastbestimmung zur Unterscheidung von LSIL und HSIL könnte durch die Bestimmung der interzellulären Verteilung der HPV-DNA-Kopien in Abstrichen, z.B. durch in-situ-Hybridisierung, erhöht werden.

Zur Evaluation der in den Tumorzellen von HPV16-positiven Zervixkarzinomen vorliegenden Viruslasten wurden via Mikrodissektion Tumorareale exzidiert. Dabei

zeigte sich interessanterweise, daß die Viruslasten zwischen vier bis zehn Kopien pro  $\beta$ -Globin-Gen-Kopie lagen. Ähnlich niedrige Werte wurden auch bei der Analyse von 19 Tonsillenkarcinomen (Klussmann et al. und Weißenborn et al., in Vorbereitung) ermittelt. Bei dieser Tumorgruppe lagen die Werte generell zwischen 0,5 und 40 HPV16-Kopien pro  $\beta$ -Globin-Gen-Kopie. In einem Fall wurde eine HPV16-DNA-Last von 153 beobachtet. Der Durchschnitt lag bei 8,5 HPV16-Kopien pro  $\beta$ -Globin-Gen-Kopie. Diese Daten für Zervixkarzinome deuten darauf hin, daß in den Tumorzellen selbst HPV-DNA-Lasten beobachtet werden, die tendenziell niedriger sind als die mediane HPV16-DNA-Last in HSIL-Zervixabstrichen. Dabei ist weiterhin zu beachten, daß es sich bei mikrodisseziertem Material wahrscheinlich ausschließlich um HPV-infizierte Zellen handelt. Hier kommt es also nicht zu „Verdünnungseffekten“ durch nicht-infizierte Zellen wie im Fall der Abstriche. Die in Abstrichen von HSIL-Patientinnen bestimmten Viruslasten spiegeln die Verhältnisse in den abgeschilferten Zellen des äußeren Epithels wider. Die Ergebnisse dieser Studie belegen zwar, daß eine starke Assoziation zwischen der Schwere der Krankheit und den HPV-DNA-Lasten besteht, ob jedoch eine Assoziation zwischen den HPV-DNA-Lasten der unteren epithelialen Schichten und den bestimmten HPV-DNA-Lasten besteht, ist unklar. Alternativ ist denkbar, daß ein höherer Anteil infizierter Keratinozyten in den Abstrichen, z.B. aufgrund größerer Läsionen, die Grundlage der Beobachtung bildet. In sofern sind zwei mögliche Ursachen erhöhten Karzinomrisikos durch erhöhte Viruslasten diskutierbar: Einerseits könnten hohe HPV-DNA-Lasten erhöhte zelluläre Konzentrationen der HPV-Onkogene zur Folge haben und so zu einer erhöhten Transformationswahrscheinlichkeit führen. Andererseits könnte bei Läsionen mit hoher Viruslast der Anteil infizierter gegenüber uninfizierten Keratinozyten stark vergrößert sein und so die Wahrscheinlichkeit für die initialen Ereignisse einer malignen Transformation erhöhen. Letztere Hypothese wird durch die Ergebnisse von in-situ Hybridisierungsexperimenten gestützt, die zeigten, daß in der Regel Zellen aus CINII- und CINIII-Läsionen weniger HPV-Kopien aufweisen als Zellen aus CINI-Läsionen (Wright, Jr. et al., 1990; Kurman et al., 1994). Eine Bestimmung der interzellulären Verteilung der HPV-DNA-Lasten in prospektiven Studien könnte zur Klärung dieser Fragestellung beitragen.

Die präsentierte Arbeit zeigt, daß sowohl bei stark proliferativen, benignen Läsionen der Haut (z.B. Warzen, Papillome) als auch bei Vorläuferläsionen des

Zervixkarzinoms hohe HPV-DNA-Lasten vorliegen. Demgegenüber finden sich bei NMHT und Psoriasisläsionen sehr niedrige Viruslasten. Das für die Psoriasis diskutierte Modell der Immunpathogenese ist mit niedrigen HPV-DNA-Lasten gut vereinbar. Das für die HPV-assoziierte NMHT-Entstehung diskutierte Modell der Apoptosehemmung durch das E6-Protein kutaner HPVs ist ebenfalls mit niedrigen HPV-DNA-Lasten vereinbar. UV-bedingte Mutationen einzelner HPV-infizierter Hautzellen würden infolge der Apoptosehemmung akkumulieren und zur monoklonalen Tumorentstehung beitragen.

Insgesamt setzt sich das Risiko maligner Entartung HPV-infizierter Epithelien vermutlich aus der Zahl infizierter Keratinozyten, der Gesamtviruslast und dem onkogenen Potential des infizierenden HPV-Typs zusammen. Eine spezifische Suszeptibilität für HPV-Infektionen, verminderte Immunkompetenz und, im Falle kutaner HPV-assoziiierter Tumoren, UV-Licht könnten zusätzliche Multiplikatoren darstellen.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Um die Viruslast in Papillomavirus-assoziierten Tumoren zu bestimmen, wurden Protokolle für die sensitive und typspezifische Quantifizierung kutaner und genitaler HPV-Typen nach der Methode der Echt-Zeit-PCR im Sondenhybridisierungsformat entwickelt.

Die HPV-DNA-Lasten in nicht-melanozytären Hauttumoren lagen im Bereich einer HPV-Kopie pro 20 bis ca. 5000 Zelläquivalente, im Vergleich zu mehreren zehntausend HPV-Kopien pro Zelläquivalent in HPV7 bzw. HPV8 induzierten Warzen. Durch hochsensitive in-situ-Hybridisierung gelang der Nachweis von HPV-DNA in vereinzelt Zellen (1-3 pro Schnitt) prämaligener und maligner Tumoren von nicht immunsupprimierten Patienten, in denen das Virus möglicherweise vegetativ repliziert. Eine HPV-E6-Onkogen-mRNA konnte auch mittels hochsensitiver RT-PCR-Protokolle nicht nachgewiesen werden. HPV ist demnach wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung des malignen Status nicht notwendig.

In DNA-Extrakten psoriatischer Läsionen betrugen die DNA-Lasten von HPV5, 20 und 36 im Mittel ein virales Genom pro ca. 1000 Zelläquivalente. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede für die unterschiedlichen Typen festgestellt werden, auch nicht beim Vergleich von psoriatischen Läsionen und gesunder Haut. Die niedrigen HPV-DNA-Lasten in NMHT und Psoriasisläsionen passen zu dem diskutierten Mechanismus der HPV-Karzinogenese nach dem „hit-and-run“-Mechanismus und zur Immunpathologie der Psoriasis durch eine papillomavirale Stimulation von T-Zellen.

Als Krankheit mit etablierter HPV-Ätiologie wurden prä maligne Genitaltumoren gewählt. 702 zervikale Abstriche von 437 HIV-negativen und HIV-positiven Frauen wurden untersucht. Die Viruslasten der HPV-Typen 16, 18, 31, 33 45 und 56 variierten um mehr als zwei Größenordnungen. Die Viruslast nahm mit steigendem Grad der Läsion signifikant zu. Die Odds-Ratio für HIV-negative Patientinnen, bei HPV-DNA-Lasten über einer HPV-Kopie/ $\beta$ -Globin-Gen-Kopie an HSIL erkrankt zu sein, betrug 12,2, für HIV-positive Patientinnen 41,2. Bemerkenswerterweise konnten durch Anwendung dieses Schwellenwertes von  $>1$  zehn HPV16-positive Fälle mit hochgradiger Dysplasie identifiziert werden, die durch das initiale zytologische Screening nicht erkannt worden waren. Der Vergleich von HPV16-Lasten in HSIL-Abstrichen mit und ohne koinfizierende HPV-Typen zeigte, daß mehrfachinfizierte

HIV-positive Patientinnen zwei- und mehrfachinfizierte HIV-negative Patientinnen dreifach höhere mediane HPV16-Lasten haben als die mit HPV16 alleine. Die HPV-Lasten in nicht-HSIL Abstrichen waren vergleichbar bei HIV-negativen und HIV-positiven Patientinnen. Im Gegensatz dazu waren bei HIV-infizierten Frauen mit HSIL im Vergleich zu HIV negativen Frauen mit HSIL die Lasten aller untersuchten HPV-Typen stark erhöht (2- >1000-fach). HIV-positive Frauen mit HSIL und CD4-Zellzahlen <200/ $\mu$ l, AIDS oder hohen HIV-RNA-Lasten (>10000/ml) wiesen zwei- bis mehr als 2000-fach höhere HPV-DNA-Lasten auf, als die mit CD4-Zellzahlen >200/ $\mu$ l, keinem AIDS oder niedrigen HIV-RNA-Lasten (<10000/ml). Die stark erhöhten HPV-DNA-Lasten bei HIV-positiven Frauen können die verlängerte Persistenz, die aggressivere Entwicklung und die reduzierten Regressionsraten intraepithelialer Läsionen und das erhöhte Risiko des Auftretens von Zervixkarzinomen erklären. Mediane HPV16-Lasten von erfolgreich antiretroviral behandelten Patientinnen mit HSIL lagen fünffach höher, als die HIV-negativer Kontrollpatientinnen. Dies mag erklären, warum die Inzidenz von Zervixkarzinomen seit der Einführung von HAART um das fünffache angestiegen ist, während die Inzidenz der meisten opportunistischen Infektionen sich verringerte.



## ABSTRACT

To investigate the role of viral loads in papillomavirus-associated tumors, sensitive and type specific real-time-PCR protocols were developed in the hybridization probe format for the quantification of cutaneous and genital HPV-types.

HPV-DNA load in non-melanoma skin cancers ranged from one HPV-copy per 20 to 5000 cell equivalents, in comparison to several ten thousand HPV-copies per cell equivalent in HPV7 or HPV8 induced warts. Using highly sensitive in-situ-hybridization, HPV-DNA could be shown in isolated cells (1-3 per section) of premalignant and malignant tumors of non-immunosuppressed patients, possibly reflecting vegetative replication of the virus. HPV-E6-oncogene-mRNA could not be detected even with highly sensitive RT-PCR protocols. Therefore, HPV is probably not necessary for maintenance of the malignant status.

In DNA-extracts of psoriatic lesions average DNA-loads of HPV-types 5, 20 and 36 were one copy per 1000 cell equivalents. No significant differences could be observed for the individual types and between samples of psoriatic lesions and normal skin. The observed low HPV-DNA loads in NMSC and psoriatic lesions are in line with the discussed „hit-and-run“-mechanism of HPV-carcinogenesis and the immunopathology of psoriasis by papillomaviral stimulation of t-cells.

As disease with established HPV-etiology, premalignant genital tumors were chosen. 702 cervical scrapes of 437 HIV-negative and HIV-positive women were investigated. Viral-loads of HPV-types 16, 18, 31, 33, 45 and 56 differed by more than two orders of magnitude. Viral load increased significantly with increasing grade of dysplasia and the odds-ratio to have HSIL with HPV16-loads higher than 1 was 12.2 for HIV-negative women and 41.2 for HIV-positive women. Applying this threshold, ten HPV16-positive cases with high grade SIL were identified, which had not been recognized by initial cytological screening.

Comparison of HPV16 loads in HSIL scrapes with and without co-infecting HPV-types revealed that multiply infected HIV-positive women had doubly- and multiply infected HIV-negative women had threefold higher median loads than those with HPV16 alone. HPV-loads were comparable in non-HSIL scrapes of HIV-negative and HIV-positive women. In contrast, in HSIL-scrapes of HIV-positive women DNA-loads of all HPV-types were strongly elevated (2 to >1000 fold) compared to HIV-negative women with HSIL. HIV-positive women with HSIL and CD4 cell counts <200/ $\mu$ l, AIDS

or high HIV-RNA levels ( $>10000/\text{ml}$ ) had two to more than 2000-fold higher HPV-DNA-loads than those with CD4 cell counts  $>200/\mu\text{l}$ , no AIDS or low HIV-RNA levels. Strongly elevated HPV-DNA loads can explain enhanced persistence, more aggressive development and reduced regression rates of SIL and the enhanced risk for cervical cancer in HIV-positive women. Median HPV16 loads in HSIL scrapes from HIV-positive women after successful antiretroviral treatment were fivefold higher than those of HIV-negative controls. This might explain that while most opportunistic infections have decreased since the introduction of HAART, the incidence of cervical cancer increased by five.

## VII. LITERATUR

**Ahdieh, L., Klein, R. S., Burk, R., Cu-Uvin, S., Schuman, P., Duerr, A., Safaeian, M., Astemborski, J., Daniel, R., and Shah, K.** (2001). Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV- negative women. *J.Infect.Dis.* **184**, 682-690.

**Antonsson, A., Forslund, O., Ekberg, H., Sterner, G., and Hansson, B. G.** (2000). The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J.Virol.* **74**, 11636-11641.

**Bavin, P. J., Giles, J. A., Deery, A., Crow, J., Griffiths, P. D., Emery, V. C., and Walker, P. G.** (1993). Use of semi-quantitative PCR for human papillomavirus DNA type 16 to identify women with high grade cervical disease in a population presenting with a mildly dyskaryotic smear report. *Br.J.Cancer* **67**, 602-605.

**Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain-Hobson, S., and Orth, G.** (1986). A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* **321**, 246-249.

**Berkhout, R. J., Bouwes Bavinck, J. N., and ter Schegget, J.** (2000). Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 2087-2096.

**Birnboim H.C. and Doly J.** (1979). A rapid alkaline lysis for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1522.

**Bland, J. M. and Altman, D. G.** (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1**, 307-310.

**Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K. V.** (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J.Natl.Cancer Inst.* **87**, 796-802.

**Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., and zur, H. H.** (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* **3**, 1151-1157.

**Boxman, I. L., Berkhout, R. J., Mulder, L. H., Wolkers, M. C., Bouwes Bavinck, J. N., Vermeer, B. J., and ter Schegget, J.** (1997). Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J.Invest Dermatol.* **108**, 712-715.

**Campo, M. S.** (1997). Bovine papillomavirus and cancer. *Vet J* **154**, 175-188.

**Cardillo, M., Hagan, R., Abadi, J., and Abadi, M. A.** (2001). CD4 T-cell count, viral load, and squamous intraepithelial lesions in women infected with the human immunodeficiency virus. *Cancer* **93**, 111-114.

**Centers for Disease Control and Prevention** (1993). 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA* **269**, 729-730.

**Chan, S. Y., Delius, H., Halpern, A. L., and Bernard, H. U.** (1995). Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J. Virol.* **69**, 3074-3083.

**Croissant, O., Breitburd, F., and Orth, G.** (1985). Specificity of cytopathic effect of cutaneous human papillomaviruses. *Clin. Dermatol.* **3**, 43-55.

**Cuzick, J., Terry, G., Ho, L., Hollingworth, T., and Anderson, M.** (1992). Human papillomavirus type 16 in cervical smears as predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia [corrected]. *Lancet* **339**, 959-960.

**de Villiers, E. M., Lavergne, D., McLaren, K., and Benton, E. C.** (1997). Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int. J. Cancer* **73**, 356-361.

**Delius, H. and Hofmann, B.** (1994). Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**, 13-31.

**Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., and Mattick, J. S.** (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4008.

**Dorrucchi, M., Suligoi, B., Serraino, D., Tirelli, U., and Rezza, G.** (2001). Incidence of invasive cervical cancer in a cohort of HIV-seropositive women before and after the introduction of highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **26**, 377-380.

**Duensing, S. and Munger, K.** (2002). Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene* **21**, 6241-6248.

**Fahey, M. T., Irwig, L., and Macaskill, P.** (1995). Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am. J. Epidemiol.* **141**, 680-689.

**Favre, M., Orth, G., Majewski, S., Baloul, S., Pura, A., and Jablonska, S.** (1998). Psoriasis: A possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of epidermodysplasia verruciformis. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 311-317.

**Flannelly, G., Jiang, G., Anderson, D., Melvin, W., Mann, E., and Kitchener, H.** (1995). Serial quantitation of HPV-16 in the smears of women with mild and moderate dyskaryosis. *J. Med. Virol.* **47**, 6-9.

**Fredericks, D. N. and Relman D.A.** (1999). Paraffin removal from tissue sections for digestion and PCR analysis. *BioTechniques* **26**, 198-200.

**Frisch, M., Biggar, R. J., Engels, E. A., and Goedert, J. J.** (2001). Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *JAMA* **285**, 1736-1745.

**Frisch, M., Biggar, R. J., and Goedert, J. J.** (2000). Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J.Natl.Cancer Inst.* **92**, 1500-1510.

**Fuchs, P. G. and Pfister, H.** (1994). Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology* **37**, 159-167.

**Galloway, D. A. and McDougall, J. K.** (1996). The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Semin.Cancer Biol.* **7**, 309-315.

**Harwood, C. A., Suretheran, T., McGregor, J. M., Spink, P. J., Leigh, I. M., Breuer, J., and Proby, C. M.** (2000). Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J.Med.Virol.* **61**, 289-297.

**Heard, I., J. M. Tassie, V. Schmitz, L. Mandelbrot, M. D. Kazatchkine, and G. Orth.** 2000. Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus- infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load. *Obstet.Gynecol.* **96**:403-409.

**Holowaty, P., Miller, A. B., Rohan, T., and To, T.** (1999). Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J.Natl.Cancer Inst.* **91**, 252-258.

**Howley, P. M. and Douglas R.Lowy** (2001). Papillomaviruses. In "Virology" (D. M. Lowy, P. M. Howley, D. E. Griffin, A. .Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and R. E. Straus, Eds.), pp. 2197-2264. Lippincott-Raven, New York.

**IARC.** IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human Papillomaviruses. (64). 1995. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

**Innis, M. A. and Gelfand, D. H.** (1990). "PCR Protocols - a Guide to Methods and Applications." Academic Press.

**J.Ferlay, F.Bray, P.Pisani, and D.M.Parkin.** GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC Press **IARC Cancer Base(No. 5.)**. 2001. Lyon.

Ref Type: Electronic Citation

**Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., and Storey, A.** (2000a). Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* **14**, 3065-3073.

**Jackson, S. and Storey, A.** (2000b). E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* **19**, 592-598.

**Jacobs, M. V., Snijders, P. J., van den Brule, A. J., Helmerhorst, T. J., Meijer, C. J., and Walboomers, J. M.** (1997). A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J.Clin.Microbiol.* **35**, 791-795.

**Josefsson, A. M., P. K. Magnusson, N. Ylitalo, P. Sorensen, P. Qwarforth-Tubbin, P. K. Andersen, M. Melbye, H. O. Adami, and U. B. Gyllensten.** 2000. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* **355**:2189-2193.

**Karasek, M. A.** (1999). Progress in our understanding of the biology of psoriasis. *Cutis* **64**, 319-322.

**Kawashima, M., Favre, M., Jablonska, S., Obalek, S., and Orth, G.** (1986). Characterization of a new type of human papillomavirus (HPV) related to HPV5 from a case of actinic keratosis. *Virology* **154**, 389-394.

**Kawashima, M., Favre, M., Obalek, S., Jablonska, S., and Orth, G.** (1990). Premalignant lesions and cancers of the skin in the general population: evaluation of the role of human papillomaviruses. *J. Invest Dermatol.* **95**, 537-542.

**Kiviat, N. B.** (1999). Papillomaviruses in non-melanoma skin cancer: epidemiological aspects. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 397-403.

**Kiviat, N. B., Koutsky, L. A., Critchlow, C. W., Lorincz, A. T., Cullen, A. P., Brockway, J., and Holmes, K. K.** (1992). Prevalence and cytologic manifestations of human papilloma virus (HPV) types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, and 56 among 500 consecutive women. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **11**, 197-203.

**Kremsdorf, D., Favre, M., Jablonska, S., Obalek, S., Rueda, L. A., Lutzner, M. A., Blanchet-Bardon, C., Voorst Vader, P. C., and Orth, G.** (1984). Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human papillomavirus types associated with epidermodysplasia verruciformis. *J. Virol.* **52**, 1013-1018.

**Kremsdorf, D., Jablonska, S., Favre, M., and Orth, G.** (1982). Biochemical characterization of two types of human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. *J. Virol.* **43**, 436-447.

**Kurman, R. J., Henson, D. E., Herbst, A. L., Noller, K. L., and Schiffman, M. H.** (1994). Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. The 1992 National Cancer Institute Workshop. *JAMA* **271**, 1866-1869.

**Kwok, S.** (1990). Procedures to minimize PCR-product carry-over. In "PCR protocols: A guide to methods and applications" (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Eds.), pp. 142-145. Academic Press., San Diego.

**Leigh, I. M., Buchanan, J. A., Harwood, C. A., Cerio, R., and Storey, A.** (1999). Role of human papillomaviruses in cutaneous and oral manifestations of immunosuppression. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **21 Suppl 1**, S49-S57.

**Lorincz, A. T.** (1996). Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **22**, 629-636.

**Lorincz, A. T., Lancaster, W. D., and Temple, G. F.** (1986). Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol.* **58**, 225-229.

**Luff, R. D.** (1992). The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: report of the 1991 Bethesda workshop. The Bethesda System Editorial Committee. *Hum.Pathol.* **23**, 719-721.

**Lungu, O., Sun, X. W., Wright, T. C., Jr., Ferenczy, A., Richart, R. M., and Silverstein, S.** (1995). A polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay method for detecting human papillomavirus in cervical carcinomas and high-grade cervical cancer precursors. *Obstet.Gynecol.* **85**, 337-342.

**Luque, A. E., Demeter, L. M., and Reichman, R. C.** (1999). Association of human papillomavirus infection and disease with magnitude of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA plasma level among women with HIV-1 infection. *J.Infect.Dis.* **179**, 1405-1409.

**Howley, P. M. and Douglas R.Lowy** (2001). Papillomaviruses. In "Virology" (D. M. Lowy, P. M. Howley, D. E. Griffin, A. .Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and R. E. Straus, Eds.), pp. 2197-2264. Lippincott-Raven, New York.

**Majewski, S., Jablonska, S., Favre, M., Ramoz, N., and Orth, G.** (1999). Papillomavirus and autoimmunity in psoriasis. *Immunol.Today* **20**, 475-476.

**Meyer, T., Arndt, R., Christophers, E., and Stockfleth, E.** (2000). Frequency and spectrum of HPV types detected in cutaneous squamous-cell carcinomas depend on the HPV detection system: a comparison of four PCR assays. *Dermatology* **201**, 204-211.

**Myers G., Baker C., Münger K., Sverdrup F., McBride A., and Bernhard H.U.** Human Papillomaviruses. 1997. Los Alamos, New Mexico, Los Alamos National Laboratory 1997.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

**Naghashfar, Z. S., Rosenshein, N. B., Lorincz, A. T., Buscema, J., and Shah, K. V.** (1987). Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J.Gen.Virol.* **68 ( Pt 12)**, 3073-3079.

**Nanda, K., McCrory, D. C., Myers, E. R., Bastian, L. A., Hasselblad, V., Hickey, J. D., and Matchar, D. B.** (2000). Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann.Intern.Med.* **132**, 810-819.

**O'Connor, D. P., Kay, E. W., Leader, M., Atkins, G. J., Murphy, G. M., and Mabruk, M. J.** (2001). p53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus associated skin cancer. *J.Clin.Pathol.* **54**, 539-542.

**Odenthal, M., Neubauer, K., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Ramadori, G.** (1993). Localization and mRNA steady-state level of cellular fibronectin in rat liver undergoing a CCl4-induced acute damage or fibrosis. *Biochim.Biophys.Acta* **19;1181**, 266-272.

**Oltersdorf, T., Campo, M. S., Favre, M., Dartmann, K., and Gissmann, L.** (1986). Molecular cloning and characterization of human papillomavirus type 7 DNA. *Virology* **149**, 247-250.

**Orth, G.** (1987). Epidermodysplasia verruciformis. *In* "The Papovaviridae, Vol.2, The Papillomaviruses" (Salzmann N.P. and Howley P.M., Eds.), pp. 199-244. Plenum Press, New York.

**Orth G., Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., Jablonska, S., Obalek, S., Jarzabek-Chorzelka, M., and Rzeska, G.** (1980). EV: A Model for the Role of Papilloma Viruses in Human Cancer. *In* "Viruses in Naturally Occuring Cancers" (M. Essex, G. Torado, and H. zur Hausen, Eds.), pp. 259-282. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor.

**Palefsky, J. M., Holly, E. A., Ralston, M. L., Da Costa, M., and Greenblatt, R. M.** (2001). Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J.Infect.Dis.* **183**, 383-391.

**Pfister, H.** (1990). "Papillomaviruses and Human Cancer." CRC Press, Boca Raton FL.

**Pfister, H.** (1996). The role of human papillomavirus in anogenital cancer. *Obstet.Gynecol.Clin.North Am.* **23**, 579-595.

**Pfister, H., Nurnberger, F., Gissmann, L., and zur, H. H.** (1981). Characterization of a human papillomavirus from epidermodysplasia verruciformis lesions of a patient from Upper-volta. *Int.J.Cancer* **27**, 645-650.

**Pfister, H. and ter Schegget, J.** (1997). Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin.Dermatol.* **15**, 335-347.

**Ramoz, N., Rueda, L. A., Bouadjar, B., Favre, M., and Orth, G.** (1999). A susceptibility locus for epidermodysplasia verruciformis, an abnormal predisposition to infection with the oncogenic human papillomavirus type 5, maps to chromosome 17qter in a region containing a psoriasis locus. *J.Invest Dermatol.* **112**, 259-263.

**Ritzkowsky, A., Weissenborn, S., Krieg, T., Pfister, H., and Wieland, U.** (2001). Extensive human papillomavirus type 7-associated orofacial warts in an immunocompetent patient. *Acta Derm.Venereol.* **81**, 130-133.

**Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levenson, C. H., and Erlich, H. A.** (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 6230-6234.

**Sambrook J. and Russel** (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Scheurlen, W., Gissmann, L., Gross, G., and zur, H. H.** (1986). Molecular cloning of two new HPV types (HPV 37 and HPV 38) from a keratoacanthoma and a malignant melanoma. *Int.J.Cancer* **37**, 505-510.

**Schutze, K., Posl, H., and Lahr, G.** (1998). Laser micromanipulation systems as universal tools in cellular and molecular biology and in medicine. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* **44**, 735-746.



- Seedorf, K., Krammer, G., Durst, M., Suhai, S., and Rowekamp, W. G.** (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* **145**, 181-185.
- Serraino, D., Carrieri, P., Pradier, C., Bidoli, E., Dorrucchi, M., Ghetti, E., Schiesari, A., Zucconi, R., Pezzotti, P., Dellamonica, P., Franceschi, S., and Rezza, G.** (1999a). Risk of invasive cervical cancer among women with, or at risk for, HIV infection. *Int.J.Cancer* **82**, 334-337.
- Serraino, D., Carrieri, P., Pradier, C., Bidoli, E., Dorrucchi, M., Ghetti, E., Schiesari, A., Zucconi, R., Pezzotti, P., Dellamonica, P., Franceschi, S., and Rezza, G.** (1999b). Risk of invasive cervical cancer among women with, or at risk for, HIV infection. *Int.J.Cancer* **82**, 334-337.
- Smola-Hess S. and Pfister, H.** (2002). Interaction of Papillomaviral Oncoproteins with Cellular Factors. In "Structure-Function Relationships of Human Pathogenic Viruses" (Holzenburg A. and Bogner E., Eds.), pp. 431-464. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Soost H.-J., Baur S., and Smolka H.** (1990). "Gynaekologische Zytodiagnostik." Thieme, Stuttgart.
- Stark, L. A., Arends, M. J., McLaren, K. M., Benton, E. C., Shahidullah, H., Hunter, J. A., and Bird, C. C.** (1994). Prevalence of human papillomavirus DNA in cutaneous neoplasms from renal allograft recipients supports a possible viral role in tumour promotion. *Br.J.Cancer* **69**, 222-229.
- Suggs, S. V., Wallace, R. B., Hirose, T., Kawashima, E. H., and Itakura, K.** (1992). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. 1981. *Biotechnology* **24:140-4.**, 140-144.
- Swan, D. C., Tucker, R. A., Tortolero-Luna, G., Mitchell, M. F., Wideroff, L., Unger, E. R., Nisenbaum, R. A., Reeves, W. C., and Icenogle, J. P.** (1999). Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J.Clin.Microbiol.* **37**, 1030-1034.
- Valdimarsson, H., Sigmundsdottir, H., and Jonsdottir, I.** (1997). Is psoriasis induced by streptococcal superantigens and maintained by M-protein-specific T cells that cross-react with keratin? *Clin.Exp.Immunol.* **107 Suppl 1:21-4.**, 21-24.
- Van de Kerkhof, P. C. and Bos, J. D.** (1995). Pathogenic aspects of psoriasis. Introduction. *Clin.Dermatol.* **13**, 97-98.
- Veress, G., Szarka, K., Dong, X. P., Gergely, L., and Pfister, H.** (1999). Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J.Gen.Virol.* **80 ( Pt 4)**, 1035-1043.
- Villa, L. L. and Schlegel, R.** (1991). Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. *Virology* **181**, 374-377.
- Walboomers, J. M.** (1994). Detection of genital human papillomavirus infections: Critical review of methods and prevalence studies in relation to cervical cancer. In "Human Papillomaviruses in Cervical Cancer" (Stern P.L. and M. Stanley, Eds.), pp. 41-71. Oxford University Press, Oxford.

**Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., and Munoz, N.** (1999b). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J.Pathol.* **189**, 12-19.

**Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., and Munoz, N.** (1999a). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J.Pathol.* **189**, 12-19.

**Weissenborn, S. J.** Molekularbiologische Untersuchungen der Desoxyribonukleinsäuren humaner Papillomviren bei Psoriasis-Patienten. 1998. Fachbereich organische Chemie der RWTH Aachen.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

**Wieland U. and Pfister, H.** (1997). Papillomaviruses in human pathology: epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. *In* "Human papilloma virus infection" (Gross G.E. and Barosso R., Eds.), pp. 1-20. Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden.

**Wieland, U., Jurk, S., Weissenborn, S., Krieg, T., Pfister, H., and Ritzkowsky, A.** (2000a). Erythroplasia of queyrat: coinfection with cutaneous carcinogenic human papillomavirus type 8 and genital papillomaviruses in a carcinoma in situ. *J.Invest Dermatol.* **115**, 396-401.

**Wieland, U. and Pfister, H.** (1996). Molecular diagnosis of persistent human papilloma virus infections. *Intervirology* **39**, 145-157.

**Wieland, U., Ritzkowsky, A., Stoltidis, M., Weissenborn, S., Stark, S., Ploner, M., Majewski, S., Jablonska, S., Pfister, H. J., and Fuchs, P. G.** (2000b). Communication: papillomavirus DNA in basal cell carcinomas of immunocompetent patients: an accidental association? *J.Invest Dermatol.* **115**, 124-128.

**Wright, T. C., Jr., Ellerbrock, T. V., Chiasson, M. A., Van Devanter, N., and Sun, X. W.** (1994). Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors, and validity of Papanicolaou smears. New York Cervical Disease Study. *Obstet.Gynecol.* **84**, 591-597.

**Wright, T. C., Jr. and Richart, R. M.** (1990). Role of human papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. *Gynecol.Oncol.* **37**, 151-164.

**Ylitalo, N., P. Sorensen, A.M. Josefsson, P.K. Magnusson, P.K. Andersen, J. Ponten, H.O. Adami, U.B. Gyllensten, and M. Melbye.** 2000. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* **355**:2194-2198.

**zur Hausen H.** (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J.Natl.Cancer Inst.* **92**, 690-698.

**zur Hausen, H.** (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **78:1-30.**, 1-30.

## VIII. ABKÜRZUNGEN

atg	Attogramm
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Karzinom
CIS	Carcinoma in situ
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA / RNA	Desoxyribonukleinsäure / Ribonukleinsäure
E	early
<i>E. coli</i>	<i>Echerichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EQ	Erythroplasie Queyrat
EtBr	Ethidiumbromid
EV	Epidermodysplasia verruciformis
fg	Femtogramm
g	Gramm
HCl	Salzsäure
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion
h	Stunde
HPV	Humanes Papillomvirus
IARC	International Agency for Research on Cancer
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo-Dalton
L	Late
LSIL	Low grade squamous intraepithelial

	lesion
M	Mol
m	milli
min	Minute
mRNA	messenger RNA
μ	mikro
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NCR	non coding region
ng	Nanogramm
nicht-HSIL	= Abstriche der Bethesda-Grade normal, ASCUS und LSIL
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
OR	Odds-Ratio
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEC	Plattenepithelkarzinom
Pg	Picogramm
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
Upm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tm	Schmelzpunkt
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheiten)
ÜN	über Nacht
V	Volt

## Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. Ulrike Wieland für die freundliche und kritische Betreuung, die zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen hat.

Besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. P. G. Fuchs, der leider die Abgabe nicht mehr miterleben darf. Neben den guten Ratschlägen und seiner Diskussionsbereitschaft hat besonders seine Fähigkeit, eine nette Atmosphäre zu verbreiten entscheidend die Zeit geprägt.

Besonders bedanken möchte ich mit auch bei Herrn Prof. H. J. Pfister, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und der immer für eine fruchtbare Diskussion die Zeit fand.

Bei Baki Akgül, Andres Müller und Manuela Rehtanz bedanke ich mich für die Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen.

Meinen Computerfachleuten Gian Paolo Marcuzzi und Thomas Müller gilt mein ehrfürchtiger Dank.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Virologie der Universität zu Köln, ganz besonders Frau Monika Junk, für die freundliche Unterstützung und das gute Arbeitsklima.

Meiner Freundin Inke Schaper möchte ich für die Unterstützung und die Geduld besonders in der heißen Endphase danken.



## Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Herbert Pfister betreut worden.

Köln, den 23. Oktober 2002

Vorveröffentlichung:

**Ritzkowsky, A., Weissenborn, S., Krieg, T., Pfister, H., und Wieland, U. (2001).** Extensive human papillomavirus type 7-associated orofacial warts in an immunocompetent patient. *Acta Derm. Venereol.* **81**, 130-133.





## Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Sönke Weißenborn  
geboren am 23. Mai 1966 in Bad Segeberg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Ausbildungsweg

1972-1976	Grundschule Birgel
1976-1986	Burgau-Gymnasium Düren
Juni 1986	Abitur am Burgau-Gymnasium Düren
Okt. 1986 - Dez. 1987	Grundwehrdienst
April 1988	Immatrikulation für das Fach Chemie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (RWTH)
Okt. 1989 - Feb. 1990	Studienreise Asien
Juli 1992 - April 1993	Studienreise Lateinamerika
April 1994 – Okt. 1997	Studium der Fächer Geschichte, Politische Wissenschaften und Volkswirtschaftslehre an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen
Sept. - Okt. 1997	Diplomprüfung in den Fächern Organische-, Anorganische- und Physikalische Chemie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der RWTH Aachen
Nov. 1997 - Mai 1998	Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der RWTH Aachen
seit Sept. 1998	Promotion im Fach Genetik an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
Okt. 2000-März 2002	Promotionsstudium im Fach Chemie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
seit August 2001	Dozent für Chemie an der Fachschule für technische Assistenten in der Medizin der Universität zu Köln

## Veröffentlichungen

Klussmann, J. P., Weissenborn, S., and Fuchs, P. G. (2001). Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N.Engl.J.Med.* **345**, 376.

Klussmann, J. P., Weissenborn, S. J., Wieland, U., Dries, V., Kolligs, J., Jungehuelsing, M., Eckel, H. E., Dienes, H. P., Pfister, H. J., and Fuchs, P. G. (2001). Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* **92**, 2875-2884.

Ritzkowsky, A., Weissenborn, S., Krieg, T., Pfister, H., and Wieland, U. (2001). Extensive human papillomavirus type 7-associated orofacial warts in an immunocompetent patient. *Acta Derm.Venereol.* **81**, 130-133.

Weissenborn, S. J., Hopfl, R., Weber, F., Smola, H., Pfister, H. J., and Fuchs, P. G. (1999). High prevalence of a variety of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses in psoriatic skin of patients treated or not treated with PUVA. *J.Invest Dermatol.* **113**, 122-126.

Wieland, U., Jurk, S., Weissenborn, S., Krieg, T., Pfister, H., and Ritzkowsky, A. (2000). Erythroplasia of queyrat: coinfection with cutaneous carcinogenic human papillomavirus type 8 and genital papillomaviruses in a carcinoma in situ. *J.Invest Dermatol.* **115**, 396-401.

Wieland, U., Ritzkowsky, A., Stoltidis, M., Weissenborn, S., Stark, S., Ploner, M., Majewski, S., Jablonska, S., Pfister, H. J., and Fuchs, P. G. (2000b). Communication: papillomavirus DNA in basal cell carcinomas of immunocompetent patients: an accidental association. *J.Invest Dermatol.* **115**, 124-128.